



**Universitat  
de Lleida**

**Treball de Final de Grau de Veterinària**  
Doble Grau en Veterinària i Ciència i Producció Animal



**CARACTERITZACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE CITOCINES EN EL RUMEN I  
ILI DE CORDERS AMB DIFERENT NIVELL DE PROTEÏNA BRUTA EN EL  
PINSO**

**Autora: Montse Pérez Miralles**  
**Tutora: Beatriz Serrano Pérez**  
**Departament de Ciència Animal**  
**Universitat de Lleida**  
**16 – 7- 2019**

## Índex

1.	ABSTRACT.....	6
2.	RESUM.....	7
3.	INTRODUCCIÓ.....	8
3.1.	CARACTERÍSTIQUES DEL TRACTE GASTROINTESTINAL EN REMUGANTS.....	13
3.2.	IMMUNITAT DE LA MUCOSA DE L'APARELL GASTROINTESTINAL .....	16
3.2.1.	<i>Immunitat de la mucosa del rumen</i> .....	17
3.2.2.	<i>Immunitat de la mucosa de l'intestí</i> .....	18
3.3.	CITOCINES .....	22
3.3.1.	<i>Interleucina-10 (IL-10)</i> .....	24
3.3.2.	<i>Factor de creixement transformant beta (TGF-<math>\beta</math>)</i> .....	25
3.3.3.	<i>Interferó gamma (IFN-<math>\gamma</math>)</i> .....	25
3.3.4.	<i>Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-<math>\alpha</math>)</i> .....	26
3.4.	EFFECTE DE LA PROTEÏNA EN EL DESENVOLUPAMENT DE LA IMMUNITAT .....	26
4.	OBJECTIUS .....	27
5.	MATERIAL I MÈTODES .....	28
5.1.	ANIMALS DE L'ESTUDI .....	28
5.2.	DISSENY EXPERIMENTAL .....	28
5.3.	METODOLOGIA .....	28
5.3.1.	<i>Homogeneïtzació de les mostres</i> .....	29
5.3.2.	<i>Extracció d'ARN</i> .....	29
5.3.3.	<i>Avaluació de la qualitat i quantitat de l'ARN</i> .....	30
5.3.4.	<i>Transcripció Reversa</i> .....	31
5.3.5.	<i>PCR a temps real</i> .....	33
5.4.	ANÀLISI ESTADÍSTIC .....	37
6.	RESULTATS .....	37
7.	DISCUSSIÓ .....	44
8.	CONCLUSIONS.....	45
9.	BIBLIOGRAFIA .....	46
10.	WEBGRAFIA.....	51
11.	ANNEXOS.....	53

## Índex figures

Figura 1. Valor econòmic de la producció final d'oví i cabrum 2017 (milions de €). Font: Renda Agrària Nacional. S.G. Estadística (MAPA), Elaboració: S.G. Productes Ramaders, 2017.....	9
Figura 2. Distribució del cens oví per CC.AA. Font: SITRAN, Elaboració: S.G. Productes Ramaders, 2018.....	10
Figura 3. Distribució del cens d'oví per països en la UE-28. Font: EUROSTAT, Elaboració: S.G. Productes Ramaders, 2017. ....	11
Figura 4. Principals orígens d'importacions de carn d'oví. Font: DATACOMEX, Elaboració: S.G. Productes Ramaders, 2017. ....	12
Figura 5. Principals destins d'exportacions de carn d'oví. Font: DATACOMEX, Elaboració: S.G. Productes Ramaders, 2017. ....	12
Figura 6. Aparell gastrointestinal oví (Court, Hides i Webb-Ware, 2010). ....	14
Figura 7. Mucoses dels diferents compartiments de l'estómac dels remugants. Papil·les del rumen (A), Cel·les del reticle (B), Omas (C) i Abomas (D) (Rojo i González, 2013).....	14
Figura 8. Intestins d'oví (Dyce, 1996).....	15
Figura 9. Les tres vies principals per les quals l'organisme animal es defensa front a la invasió microbiana (Tizard, 2009). ....	16
Figura 10. Drenatge limfàtic del rumen (Tizard, 2010). ....	18
Figura 11. Estructura del tracte gastrointestinal (Andrew, 2012).....	18
Figura 12. Unió estreta de les cèl·lules epitelials (Andrew, 2012).....	19
Figura 13. Vellositats intestinals (Van, 2010). ....	19
Figura 14. La funció de barrera de la mucosa inclou una capa de glicocàlix i de mucositat en les microvellositats (Andrew, 2012).....	20
Figura 15. Superfície intestinal i unitat vellositat - cripta (Andrew, 2012). ....	20
Figura 16. Microanatomia de les Plaques de Peyer (Andrew, 2012). ....	21
Figura 17. Anatomia de les PP i els nòduls limfàtics. ....	22
Figura 18. Activació del sistema immune innat a través de la unió dels PAMP o les alarmines als PRR. ....	23
Figura 19. Les cèl·lules dendrítiques presenten l'antigen i proporcionen senyals coestimuladores a les cèl·lules T que determinen la resposta de les cèl·lules T efectores (Roitt, 2013). ....	23
Figura 20. Les citocines produïdes per les DC o altres cèl·lules de la immunitat innata, determinen la diferenciació de la cèl·lula T (Roitt, 2013).....	24
Figura 21. Recuperació de la fase aquosa. ....	30
Figura 22. NanoDrop (Thermoscientific).....	31
Figura 23. Termociclador i centrifugadora.....	32
Figura 24. Termociclador per a PCR. ....	36
Figura 25. Fases de la PCR. ....	36
Figura 26. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) d'IFN- $\gamma$ en rumen front al tipus de tractament. ....	38
Figura 27. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) d'IFN- $\gamma$ en ili front al tipus de tractament. ....	39
Figura 28. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) de TNF- $\alpha$ en rumen front al tipus de tractament. ....	39
Figura 29. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) de TNF- $\alpha$ en ili front al tipus de tractament. ....	40

Figura 30. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) d'IL-10 en rumen front al tipus de tractament. ....	40
Figura 31. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) d'IL-10 en ili front al tipus de tractament. ....	41
Figura 32. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) de TGF- $\beta$ en rumen front al tipus de tractament. ....	41
Figura 33. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) de TGF- $\beta$ en ili front al tipus de tractament. ....	42
Figura 34. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) de les citocines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 i TGF- $\beta$ en rumen. ....	42
Figura 35. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) de les citocines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 i TGF- $\beta$ en ili. ....	43
Figura 36. Mitjana i error estàndard del pes al sacrifici front al tipus de tractament. ....	43

## Índex taules

Taula 1. Número d'explotacions de ramat oví per classificació zootècnica per CC.AA. Font: SITRAN, Elaborat: S.G. Productes Ramaders, 2018.....	9
Taula 2. Evolució del cens del ramat oví per tipus d'animals a Espanya. Font: SITRAN, Elaboració: S.G. Productes Ramaders, 2018. ....	10
Taula 3. Comerç espanyol en el sector oví i caprí 2009/2017. Font: A.E.A.T., Elaboració: S.G. Productes Ramaders, 2017. ....	11
Taula 4. Preparació dels reactius per a la RT en funció de les recomanacions del fabricant. ....	32
Taula 5. Preparació dels reactius per a la transcripció reversa (RT) en funció de les recomanacions del fabricant. ....	33
Taula 6. Seqüències i referència dels primers utilitzats per a la qPCR.....	34
Taula 7. Resultats de les corbes d'eficiència. ....	35
Taula 8. Reactius utilitzats en la qPCR. ....	36

## 1. Abstract

Sheep meat production is comparable to other meat products in Spain and has a market within and outside the European Union, being the second largest producer after the United Kingdom. However, it is a very backward sector in terms of infrastructures, technification and the fact of being bound to the land and subsidies; this has led to a loss of activity and the lack of young entrepreneurs. In this framework, optimizing the costs of feeding could be beneficial, since diets for fattening lambs in Spain have some levels of gross protein (PB) that exceed the nutritional needs. To do this, it is necessary to understand how the reduction of PB affects the balance between the immune mechanisms of defense and tolerance of the gastrointestinal tract. Given that, low protein diets have been related in states of oxidative stress (EO), which is associated in the formation of free radicals and proinflammatory cytokines, which causes damage to the intestinal mucosa. The objective of this study was to evaluate the effect of the level of PB in the diets of the lambs regarding the gene expression of proinflammatory cytokines (IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF- $\beta$ ), as ruminal and intestinal health indicators. Male lambs of the Ripollés breed have been used of 45-60 days. The animals have been fed in two phases: growth from 14 to 19 kg and fattening of 19 to 25 kg live weight. Half of the lambs received a control feed (20,4 % and 19,1 % PB on the basis of dry matter (MS), respectively) and the rest received a low content of PB (18,3 % and 17,4 % on the MS). At the time of slaughter, samples of rumen and ileum of 8 lambs ( $n = 4$  for each treatment) were taken that were stored in RNA later until the time of extraction. RNA was extracted using the Trizol protocol, treated with DNase and DNA was obtained by reverse transcription in the presence of random initiators. The gene expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$  and the reference genes GAPDH and ACTB were determined by real-time PCR in rumen and ileum. In the results no significant differences were observed in the gene expression of cytokines in rumen and ileum between control animals and those fed with low PB content at the time of sacrifice ( $P > 0,05$ ). On the other hand, however, it must be taken into account that the use of nutrients is conditioned by the genetic potential of growth and the health status of the lambs. That is, under the conditions of experiment, we can assume that there are no significant differences between the two treatments, but these results should be confirmed in other health conditions or in other breeds. In conclusion, the reduction of 2% of PB in the feed of fattening lambs did not adversely affect the immune response in the gastrointestinal tract.

## 2. Resum

La producció d'oví de carn és paragonable a la resta de produccions càrniques d'Espanya i compta amb un mercat dintre i fora de la Unió Europea, sent la segona major productora després del Regne Unit. No obstant això, és un sector molt endarrerit pel que fa a les infraestructures, la tecnificació i al fet de romandre lligat a la terra i a les subvencions; això ha comportat una pèrdua de l'activitat i la manca de joves emprenedors. En aquest marc, optimitzar els costos d'alimentació podria ser beneficiós, ja que les dietes per a corders d'engreix a Espanya tenen uns nivells de proteïna bruta (PB) que excedeixen les necessitats nutricionals. Per fer-ho és necessari comprendre com afecta la reducció de PB en el balanç entre els mecanismes immunitaris de defensa i tolerància del tracte gastrointestinal. Donat a què, dietes baixes en proteïnes s'han relacionat en estats d'estrès oxidatiu (EO), que s'associa en la formació de radicals lliures i citocines proinflamàtòries la qual cosa provoca danys en la mucosa intestinal. L'objectiu d'aquest estudi ha estat avaluar l'efecte del nivell de PB en les dietes dels corders respecte l'expressió gènica de citocines proinflamàtòries (IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ) i citocines antiinflamàtòries (IL-10 i TGF- $\beta$ ), com indicadors de salut ruminal i intestinal. S'han utilitzat corders mascle de la raça Ripollesa de 45 - 60 dies d'edat. Els animals han estat alimentats en dos fases: creixement de 14 a 19 kg i engreix de 19 a 25 kg de pes viu. La meitat dels corders van rebre un pinso control (20,4% i 19,1% de PB sobre la base de matèria seca (MS), respectivament) i la resta van rebre un baix contingut de PB (18,3% i 17,4% sobre la MS). En el moment del sacrifici, es van prendre mostres de rumen i ili de 8 corders (n= 4 per a cada tractament) que es van conservar en *RNA later* fins al moment de la seva extracció. El ARN es va extreure mitjançant el protocol Trizol, es va tractar amb DNAses i es va obtenir l'ADN còpia mitjançant transcripció reversa en presència d'iniciadors *random*. L'expressió gènica de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$  i els gens de referència GAPDH i ACTB es van determinar mitjançant PCR a temps real en rumen i ili. En els resultats no es van observar diferències significatives en l'expressió gènica de citocines en rumen i ili entre els animals control i els alimentats amb baix contingut de PB en el moment del sacrifici ( $P > 0,05$ ). D'altra banda, però, s'ha de tenir en compte que l'aprofitament dels nutrients ve condicionat pel potencial genètic de creixement i l'estat sanitari dels corders. És a dir, sota les condicions de l'experiment podem suposar que no hi ha diferències significatives entre ambdós tractaments, però s'haurien de confirmar aquests resultats en altres condicions sanitàries o en altres races. En conclusió, la reducció del 2% de la PB en el pinso de corders d'engreix no va afectar negativament en la resposta immune en el tracte gastrointestinal.

### 3. Introducció

L'explotació ovina ha desenvolupat un paper important al llarg de la història, tant en la producció d'aliments, cuirs i fibres, com en l'aprofitament dels recursos marginals. Això ha marcat la trajectòria del sector oví en els aspectes econòmics, socials i mediambientals.

Per un costat, la gestió del ramat oví engloba els criteris específics de producció animal, la qualitat diferenciada dels seus productes i la preservació i el manteniment dels ecosistemes (conservació del paisatge, disminució del risc d'incendis forestals i de l'erosió, etc.). Tanmateix, el fet de ser una producció molt localitzada en zones desfavorides (més del 80% del cens es troba en zones amb especials dificultats), que utilitza sistemes productius tradicionals condicionants del nostre paisatge rural, ha comportat a un especial règim de suport (MAGRAMA, 2012).

Per l'altre, es va crear l'Organització Comú de Mercats (OCM) en el sector. Aquesta pretenia aconseguir una major estabilitat en el mercat de la carn d'oví i assegurar un nivell de rendes adequat als productors. Incloïa ajudes directes, basades en un sistema de drets de prima, i un règim d'intervenció pública i privada que permetia l'emmagatzematge de la carn d'oví i caprí.

Paral·lelament, les successives reformes de la Política Agrícola Comú (PAC), han anat modelant el règim de suport al sector oví, complementant-se amb plans d'actuació nacionals. La seva finalitat ha estat la d'afavorir l'estabilitat de rendes als productors per tal de preservar un sector fort i competitiu.

Així doncs, estem davant d'un sector el qual està condicionat per molts factors els quals dificulten que es pugui sustentar per si sol, sense ajudes i sense romandre lligat al territori. A aquests condicionants es sumen les fluctuacions dels preus obtinguts per la carn o la llet, el cost de les matèries primes per a l'alimentació, despeses com la llum, l'aigua i el gasoil i inclús determinades circumstàncies que puguin afectar negativament com l'aparició d'epizoòties, descens del consum, degut a crisis alimentàries o per pèrdua del poder adquisitiu de les famílies, etc. Tot això ocasiona un abandonament de l'activitat per part dels productors i la dificultat d'incorporació de joves emprenedors, així com, l'obstaculització d'iniciatives per a modernitzar les estructures o adquirir mà d'obra qualificada.

No obstant això, dintre de la ramaderia el sector oví té una gran demanda i és bastant competitiu. Les xifres del 2017 revelen un cens ramader de 15.963.107 caps d'oví *versus* 137.500.000 caps d'aus de corral, 29.971.357 caps de porcí, 6.465.747 caps de boví, 5.967.184 caps de conill, 3.059.731 caps de caprí i 260.961 caps de cavall (FAOSTAT, 2017). D'altra banda, en comparativa, l'any 2017 van haver-hi 9,80 milions de caps d'oví sacrificats *versus* 760,6 milions de caps de *broiler* sacrificats, 49,65 milions de caps de porcí sacrificats, 45,8 milions de caps de conill sacrificats, 2,38 milions de caps de boví sacrificats, 1,36 milions de caps de caprí sacrificats i 44.493 caps d'equí sacrificats (MAPAMA, 2017).



A més, la producció càrnia d'oví i cabrú supera la producció làctia, 62% *versus* 38% respectivament (Fig. 1).



Figura 1. Valor econòmic de la producció final d'oví i cabrum 2017 (milions de €). Font: Renda Agrària Nacional. S.G. Estadística (MAPA), Elaboració: S.G. Productes Ramaders, 2017.

El número d'explotacions de ramat oví és majoritari a Galicia (22.607), Andalusia (20.664), Extremadura (16.642) i Castilla i Lleó (10.966) (Taula 1). Tot i que, veiem que hi ha un major cens a Extremadura (22,1%), Castilla i Lleó (18,3%) i Castilla La Manxa (15,9%) (Fig. 2). Aquestes autonomies compten amb una alta densitat en zones rurals i zones precàries, la qual cosa facilita aquesta forma de producció.

Taula 1. Número d'explotacions de ramat oví per classificació zootècnica per CC.AA. Font: SITRAN, Elaborat: S.G. Productes Ramaders, 2018.

NÚMERO DE EXPLOTACIONES DE GANADO OVINO POR CLASIFICACIÓN ZOOTÉCNICA POR COMUNIDADES AUTÓNOMAS (sólo con Estado de Alta a 01/01/2018)							
Comunidad Autónoma	Cebo o cebadero	Precebo	Reproducción para Producción de leche	Reproducción para Producción de Carne	Reproducción Mixta	Otras clasificaciones	Total
Andalucía	182	11	1.731	14.107	4.381	235	20.664
Aragón	78	0	24	3.730	6	1.006	4.854
Asturias	5	0	6	4.815	1.436	173	6.435
Baleares	37	0	9	3.943	61	112	4.162
Canarias	42	0	152	373	701	13	1.281
Cantabria	0	0	18	2.013	625	548	3.204
Castilla La Mancha	232	0	1.554	2.835	1.244	724	6.590
Castilla y León	165	0	2.330	6.702	486	1.269	10.966
Cataluña	212	0	20	2.817	23	624	3.706
Ceuta	4	0	0	0	0	1	5
Extremadura	128	0	196	15.799	458	61	16.642
Galicia*	2	0	8	22.399	9	182	22.607
Madrid	26	0	176	669	48	66	1.014
Melilla	3	0	0	0	0	2	5
Murcia	79	0	5	1.680	23	37	1.824
Navarra	19	0	304	1.954	5	296	2.591
País Vasco	21	0	362	5.435	555	93	6.472
La Rioja	22	0	5	306	4	35	372
Valencia	63	0	18	1.187	2	132	1.432
ESPAÑA	1.320	11	6.918	90.764	10.067	5.609	114.826

Fuente: SITRAN

Elaboración: S. G. Productos Ganaderos.

Actualizado enero 2018

\* En Galicia el número de explotaciones representa a todas las explotaciones de pequeños rumiantes

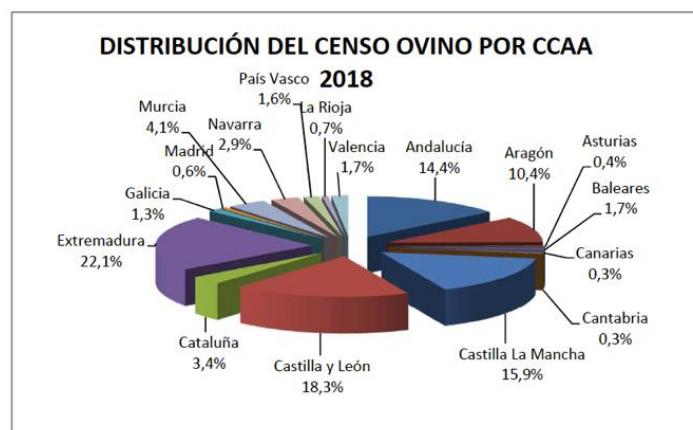


Figura 2. Distribució del cens oví per CC.AA. Font: SITRAN, Elaboració: S.G. Productes Ramaders, 2018.

D'altra banda, el cens del ramat oví ha minvat des del 2007 fins al 2018 (Taula 2). S'ha passat d'un cens de 23.029.817 caps a un de 16.770.926 caps. No obstant això, del 2013 al 2018 el cens s'ha mantingut prou sostingut, sofrint petites variacions en comparació als anys anteriors, això pot ser degut a les constants reformes del regim de suport i a la millora de la tecnificació del sector.

Taula 2. Evolució del cens del ramat oví per tipus d'animals a Espanya. Font: SITRAN, Elaboració: S.G. Productes Ramaders, 2018.

EVOLUCIÓN DEL CENSO DE GANADO OVINO POR TIPO DE ANIMALES EN ESPAÑA						
	No Reproductores de 4 a 12 meses	No Reproductores menores de 4 meses	Reproductoras Hembra	Reproductores Macho	Total	% respecto al año anterior
2006	694.854	1.889.689	16.942.777	382.436	19.909.756	
2007	983.528	2.386.373	19.191.711	468.205	23.029.817	100
2008	914.225	2.262.376	19.053.772	490.169	22.720.542	-1,34
2009	855.395	2.212.328	18.940.220	431.784	22.439.727	-1,24
2010	803.854	2.246.003	17.340.560	418.748	20.809.165	-7,27
2011	812.327	2.628.235	16.305.693	418.152	20.164.407	-3,10
2012	889.289	2.540.196	13.083.363	881.346	17.394.194	-13,74
2013	924.444	2.448.690	12.836.508	399.427	16.609.069	-4,51
2014	859.467	2.664.774	12.652.661	395.551	16.572.413	-0,22
2015	930.620	2.564.951	12.475.081	390.466	16.361.118	-1,27
2016	1.043.934	2.894.362	12.550.441	393.636	16.882.373	3,19
2017	975.594	2.825.778	12.672.120	400.193	16.873.685	-0,05
2018*	994.871	2.784.412	12.593.775	397.868	16.770.926	-0,61
%DIF 17/18	1,98	-1,46	-0,62	-0,58	-0,61	
%DIF 07/18	1,15	16,68	-34,38	-15,02	-27,18	

Fuente: SITRAN  
Elaboración: SG Productos Ganaderos  
\*Datos de ENERO 2018

A nivell europeu també hi ha un mercat dedicat a la carn ovina i caprina, el grau d'importacions totals, però, ha disminuït en els últims 6 anys; en canvi, s'ha incrementat

notablement el número d'exportacions totals (Taula 3). Tanmateix, si observem la distribució del cens oví en els països de la Unió Europea (Fig. 3), podem veure que en primer lloc es troba el Regne Unit (27%), seguit d'Espanya (19%) i Romania (12%), això manifesta la importància d'aquest tipus de producció no només en el nostre país sinó a nivell europeu.

*Taula 3. Comerç espanyol en el sector oví i caprí 2009/2017. Font: A.E.A.T., Elaboració: S.G. Productes Ramaders, 2017.*

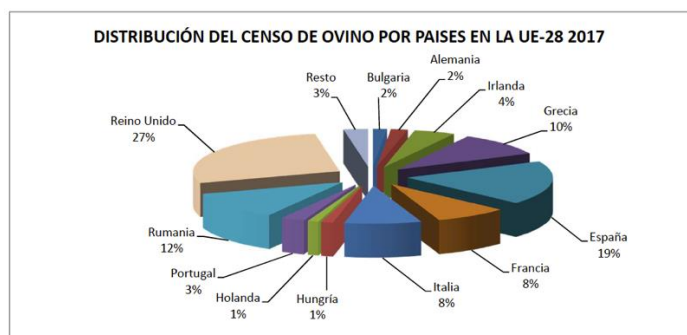
COMERCIO ESPAÑOL EN EL SECTOR OVINO Y CAPRINO 2009/2017 (TONELADAS incluyendo animales vivos y carne fresca, refrigerada y congelada)								
Año	Imp. UE	Imp. P. Ter.	Imp. Total	Exp. UE	Exp. P. Ter.	Exp. Total	% VARIACION IMPORTACION ES (respecto año anterior)	% VARIACION EXPORTACION ES (respecto año anterior)
2009	9.152	8.547	17.699	29.018	497	29.515		
2010	9.074	9.290	18.364	38.024	1.339	39.363	3,75	33,37
2011	10.220	8.279	18.498	38.839	2.785	41.624	0,73	5,74
2012	9.781	3.877	13.658	39.228	13.340	52.567	-26,16	26,29
2013	10.806	3.903	14.708	41.434	22.276	63.710	7,69	21,20
2014	12.136	3.250	15.386	37.036	28.387	65.424	4,61	2,69
2015	10.924	4.469	15.393	36.613	39.040	75.653	0,04	15,64
2016	10.559	3.411	13.970	38.526	50.062	88.588	-9,25	17,10
2017*	11.491	1.301	12.792	36.870	50.485	87.355	-8,43	-1,39

\* Los datos 2017 son provisionales

Fuente: A.E.A.T.

Elaboración: S.G. Productos Ganaderos.

Códigos Taric: 0204; 0104



*Figura 3. Distribució del cens d'oví per països en la UE-28. Font: EUROSTAT, Elaboració: S.G. Productes Ramaders, 2017.*

Les importacions de carn d'oví a Espanya (Fig. 4) es donen principalment a Itàlia (30%), Grècia (16,2%) i França (13,9%), mentre que les exportacions (Fig. 5), es donen primordialment a França (33,3%), Itàlia (12,8%) i Algèria (5,3%).

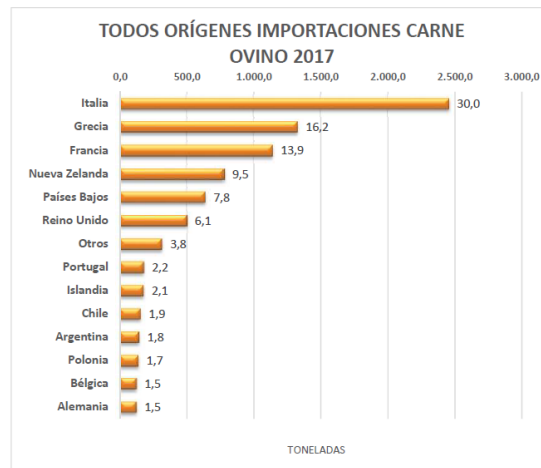


Figura 4. Principals orígens d'importacions de carn d'oví. Font: DATACOMEX, Elaboració: S.G. Productes Ramaders, 2017.

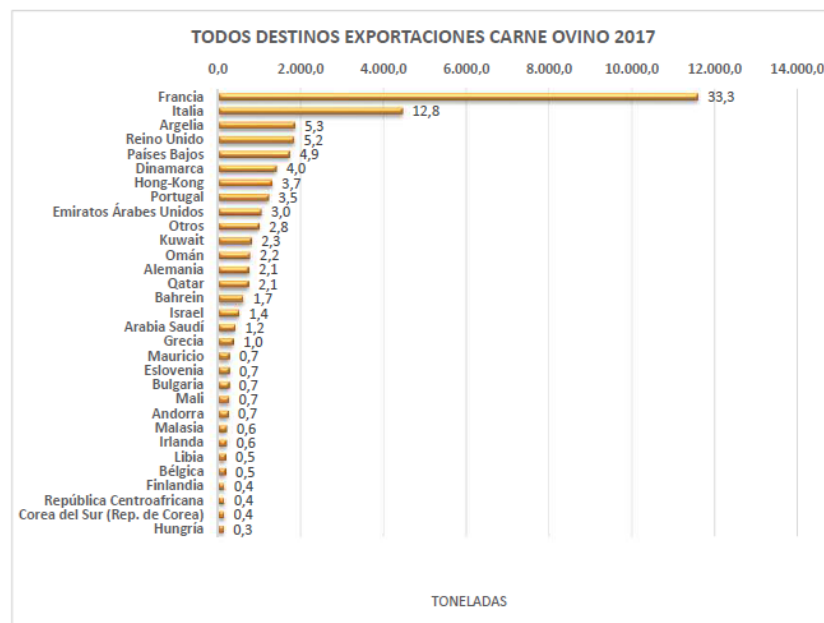


Figura 5. Principals destins d'exportacions de carn d'oví. Font: DATACOMEX, Elaboració: S.G. Productes Ramaders, 2017.

Per tant, sabent que la producció ovina depèn de molts factors per a subsistir i la importància que té el seu producte final tant a nivell nacional com europeu, s'haurien d'intentar millorar els aspectes productius per tal de disminuir, en mesura de lo possible, les despeses al mateix temps que s'incrementen els beneficis.

En aquest marc, la proteïna bruta (PB) de la dieta té un gran impacte sobre els costos d'alimentació. Les empreses espanyoles incorporen un ampli rang de continguts en PB (15 – 20,4% PB sobre matèria seca) (Bello et al., 2016) en el concentrat de corders d'engreix. Existeix poca investigació en l'àrea de les necessitats proteiques de les races

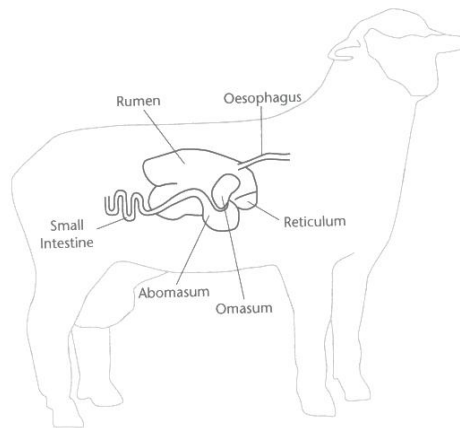
espanyoles utilitzades per a la producció de carn. No obstant això, FEDNA (2008) va estimar que les necessitats en corders de races autòctones de 15 a 25 kg eren del 15,6 % de PB. Mentre que les normes NRC (2007) d'oví varen determinar que, en races de maduresa precoç, les necessitats de PB oscil·laven entre 11,7 – 12,8% i l'INRA va establir que un corder entre els 15 i els 25 kg de pes viu tenia unes necessitats d'entre 16,2 % i 15,1 % de PB.

### **3.1. Característiques del tracte gastrointestinal en remugants**

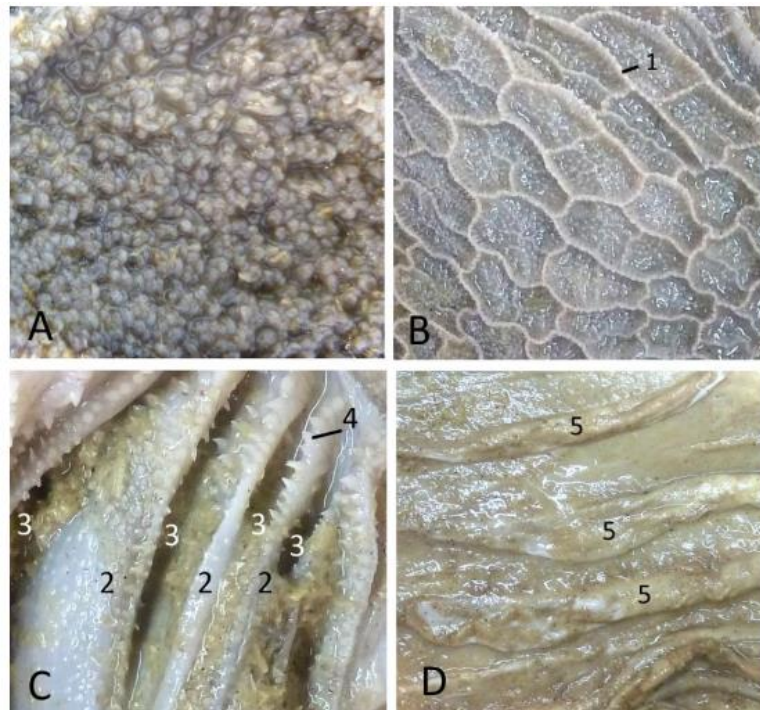
El tracte gastrointestinal s'inicia a la boca i s'estén fins a l'anús, podent-se dividir en el tracte superior i inferior.

Per un costat, el tracte superior, comença a la boca i inclou tota la longitud de l'esòfag, aquest és un tub muscular que utilitza l'acció de la peristalsis per impulsar els aliments cap a l'estómac. L'estómac dels remugants és compost (està format per dos tipus de mucoses, glandular i no glandular) i està constituït per 4 cavitats (Fig. 6 i 7). Les tres primeres són: rumen, reticle i omas i comprenen el denominat proventricle. Aquestes estan formades per mucosa no glandular i realitzen la digestió dels hidrats de carboni presents en elevat percentatge en la dieta dels remugants. S'encarreguen de la degradació enzimàtica i la subdivisió dels aliments, sobretot de la cel·lulosa, a través de la flora microbiana i la síntesis d'àcids grassos de cadena curta (àcids acètic, propiònic i butíric).

El rumen té funció d'estómac centrífug, afavoreix el retorn de l'aliment cap al reticle i participa en l'acte de la rumia. Es caracteritza per la presència de papil·les que s'encarreguen de reabsorbir sobretot, àcids grassos de cadena curta produïts per microorganismes durant la digestió, però també, entre altres substàncies, aigua, unions nitrogenades no proteiques, vitamina B i vitamina K. El reticle, pertany funcionalment al rumen i té una aparença que recorda a un panel d'abelles, entre el rumen i el reticle, l'aliment es desplaçat d'un lloc a l'altre. Durant la rumia les masses grosseres de menjar, passen de l'atri del rumen a l'esòfag i es mastiquen novament a la cavitat oral. Un cop s'ha reduït suficientment la mida l'aliment es transportat cap a l'omas a través de l'orifici reticulomasic, el qual està format per nombroses lamines de diferents longituds que recorden un llibre, aquí s'acaben de filtrar les partícules abans de passar-les a l'omas i també es recupera l'aigua provinent del bolus alimentari i es reabsorbeixen substàncies minerals. El quart compartiment és l'abomas o ventricle, amb mucosa glandular comparable a l'estómac dels animals monogàstrics (Rojo i González, 2013). En el seu interior es produeixen forts plegaments mucosos de trajectòria espiralada que no desapareixen amb la seva extensió. És on es du a terme la digestió pròpiament dita, ja que s'encarrega de la secreció d'àcid clorhídric i d'enzims digestius que faciliten la digestió de carbohidrats, proteïnes microbianes produïdes al rumen i proteïnes que escapen a la fermentació ruminal abans de què l'aliment passi al tracte gastrointestinal inferior.



*Figura 6. Aparell gastrointestinal oví (Court, Hides i Webb-Ware, 2010).*



*Figura 7. Mucoses dels diferents compartiments de l'estómac dels remugants. Papil·les del rumen (A), Cel·les del reticle (B), Omas (C) i Abomas (D) (Rojo i González, 2013).*

Per l'altre, el tracte inferior, està compost per l'intestí prim i gruixut, ambdós es localitzen a la cavitat abdominal, i desemboquen a l'anús.

L'intestí prim comprèn el duodè, el jejú i l'ili. El duodè participa en el procés de la digestió, donat a què, rep les secrecions pancreàtiques i biliars a través dels conductes. D'altra banda, el jejú uneix el duodè i l'ili i és la primera secció que compta amb microvil·lis al llarg de la superfície de la mucosa. L'ili és la secció final de l'intestí prim i és on la major part dels nutrients són absorbits degut a què compta amb un elevat nombre de vellositats localitzades a la superfície de la mucosa. La presència de vellositats en la



superfície del lumen del jejú i l'ili incrementen l'àrea d'absorció dels nutrients (Andrew, 2012).

Tanmateix, el sistema immune associat al tracte digestiu dels remugants està format per cèl·lules limfoides presents en teixits limfoides organitzats principalment en plaques de Peyer, i en menor proporció, en tota la làmina interna de l'intestí com cèl·lules intraepitelials (Tizard, 2002). Els remugants tenen dos tipus de plaques de Peyer, les de l'ili (PPI) i les jejunal (PPY), les quals difereixen en el seu desenvolupament, composició cel·lular i funció (Landsverk et al., 1991).

L'intestí prim acaba i comença l'intestí gruixut, a la vàlvula ileocecal, que és on es localitza el cec. Els remugants compten amb grans bosses cecals les quals contenen grans quantitats de bacteries que ajuden en la digestió dels aliments fibrosos. El cec connecta l'ili amb el colon, on la majoria d'aigua, vitamines i sals vitals contingues a les femtes són absorbides. El colon es pot dividir en colon ascendent, colon transvers, colon descendent i colon sigmoide (Fig. 8). Es poden trobar agregats limfoides induïbles al llarg del cec i el colon; no obstant això, les Plaques de Peyer estan absents a l'intestí gruixut (Andrew, 2012).

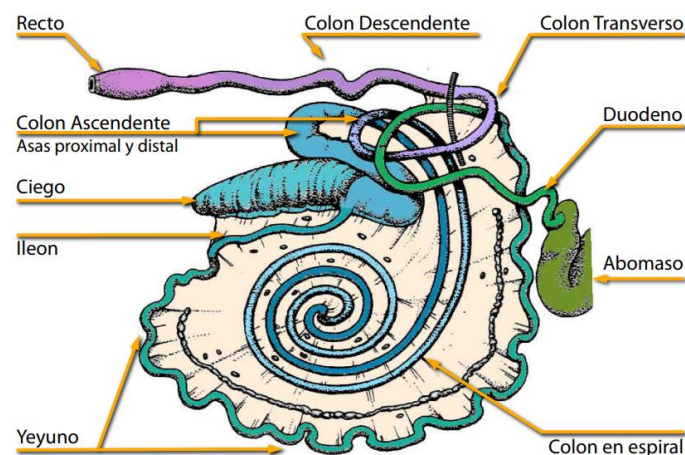
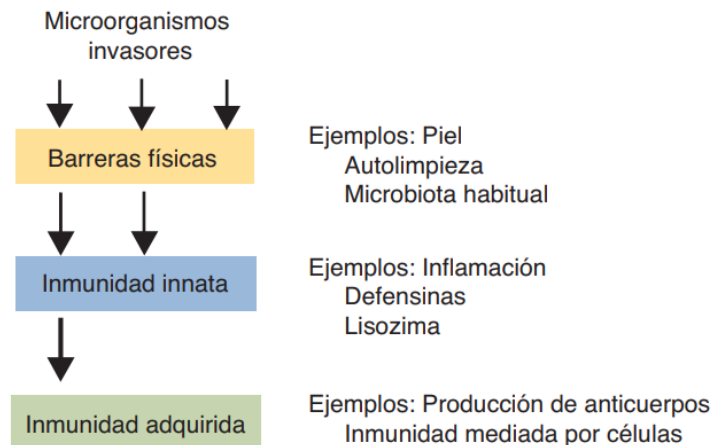


Figura 8. Intestins d'oví (Dyce, 1996).

Finalment, les femtes són empeses des del colon sigmoide cap al recte on seran emmagatzemades.

### 3.2. Immunitat de la mucosa de l'aparell gastrointestinal

El sistema immune protegeix a l'animal front a la invasió microbiana essent essencial per a la vida. En aquest context, existeixen 3 línies de defensa per a protegir a l'organisme dels agents microbians: les barreres físiques que exclouen als patògens, la immunitat innata que ofereix una protecció inicial ràpida i la immunitat adquirida que proporciona una immunitat perllongada i efectiva (Fig. 9).



*Figura 9. Les tres vies principals per les quals l'organisme animal es defensa front a la invasió microbiana (Tizard, 2009).*

Com a resultat, un organisme que hagi travessat la primera línia de defensa haurà d'enfrontar-se a una segona barrera de grau superior, i així successivament.

La primera línia de defensa del tracte gastrointestinal consisteix en impedir l'entrada d'antígens estranys al cos des del lumen dels teixits de la mucosa mitjançant l'ús de diversos mecanismes. Alguns d'aquests són específics del lloc, com per exemple, la peristalsis gastrointestinal, l'ambient àcid de l'estómac per evitar la deposició antigènica, el vòmit, la diarrea i la presència de microbiota comensal establerta a l'intestí. El sistema immunitari discrimina contínuament els bacteris comensals i patògens, per tal de mantenir l'homeòstasi en el tracte gastrointestinal.

La segona línia de defensa, la immunitat innata, té lloc quan els antígens han travessat la barrera física, aquesta es basa en el reconeixement dels microorganismes invasors a través dels seus Patrons Moleculars Associats a Patògens (PAMPs). La destrucció d'aquests antígens es realitza mitjançant el reclutament de cèl·lules (neutròfils i macròfags) a la zona d'invasió mitjançant mecanismes d'inflamació, els quals s'encarreguen de destruir-los. Cada infecció es tracta de la mateixa manera, la intensitat i la duració de la inflamació es mantenen inalterades, no hi ha ningun tipus de memòria, però el sistema immunitari sempre està llest i actua immediatament quan es detecta un patògen.

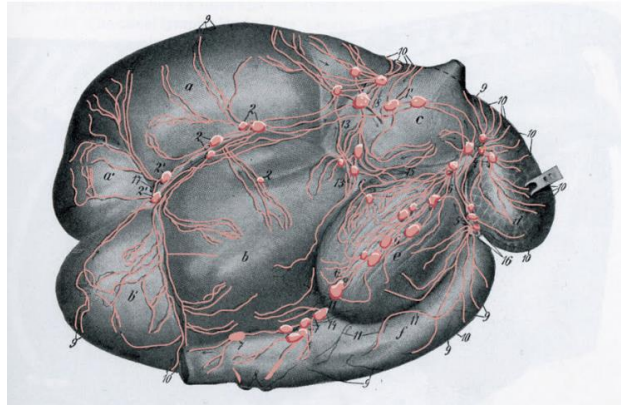


Per últim, la tercera línia de defensa, la immunitat adquirida, es intervinguda per limfòcits B i limfòcits T. Morfològicament són indistingibles entre ells. Els limfòcits B són responsables del sistema immunitari mediat per anticossos, mentre que els limfòcits T són responsables del sistema immunitari mediat per cèl·lules. Per a ser immunitàriament competents, migren a compartiments corporals específics amb l'objectiu de madurar i expressar marcadors i receptors de superfície específics (Gartner, 2017). Té la capacitat de recordar prèvia exposició als mecanismes invasors estranys, i desenvolupar una resposta més ràpida i efectiva a subsegüents exposicions a un patògen. Assegura la supervivència de l'animal davant a les contínues amenaces microbianes (Tizard, 2009).

### **3.2.1. Immunitat de la mucosa del rumen**

La superfície del rumen està recoberta per un epitelí escamós estratificat. Les seves defenses tenen més en comú en la pell que la resta del tracte gastrointestinal. Encara que aquest epitelí és en gran mesura impermeable, la presència d'una font ampla d'antígens microbians suggereix que s'han de prendre certes mesures per a defensar-se contra les fuites i que es desencadeni una profunda influència sobre els sistemes immunitaris innat i adaptatiu dels animals. Alguns trastorns del metabolisme del rumen, causats majoritàriament per l'administració de dietes molt energètiques, provoquen canvis en la microbiota ruminal, un augment dels àcids grassos i etanol, una disminució del pH del rumen i un desenvolupament d'acidosis subaguda del rumen. Això, provoca una inflamació local, l'apertura de les unions intercel·lulars i una alteració de la funció de barrera de l'epitelí escamós ruminal, la qual cosa pot permetre que els PAMP bacterians, com les endotoxines, els flagels i altres productes microbians, creuin la paret ruminal i entrin a la sang. Al mateix temps, pot causar endotoxèmia, una resposta immunitària innata sistèmica, una resposta de fase aguda i inflamació sistèmica perllongada.

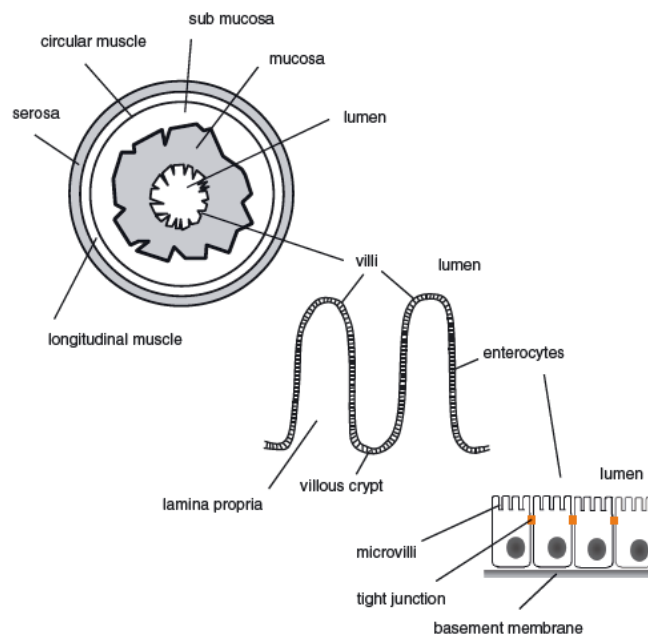
Encara no es coneix molt sobre les interaccions entre el rumen i el sistema immunitari. Els vasos limfàtics ruminals drenen en molts de nòduls limfàtics (Fig. 10). Els receptors de tipus toll (TLR), com TLR4, les citocines com la IL-1 $\beta$  i la IL-10 i la captasa 1 poden trobar-se en les parets ruminals, la qual cosa suggereix que en aquest nivell poden produir-se inflamacions en facilitat. En el contingut ruminal hi ha IFN- $\gamma$  i limfòcits T i B. Sembla que la microbiota ruminal pot comunicar-se amb els seus teixits limfoides associats i, d'aquesta manera, promoure les respostes reguladores. Hi ha poca evidència de què la microbiota ruminal moduli directament el desenvolupament del sistema immunitari, però s'ha suggerit que els sistemes immunitaris innats complexos dels rumugants, sobre tot en la seva gran diversitat de pèptids antimicrobians, poden haver evolucionat en resposta a aquesta font d'invasió microbiana (Tizard, 2018).



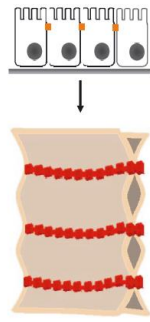
*Figura 10. Drenatge limfàtic del rumen (Tizard, 2010).*

### **3.2.2. Immunitat de la mucosa de l'intestí**

Per un costat, l'epiteli del tracte intestinal comprèn un epiteli cilíndric simple, una única capa de cèl·lules epitelials que forma la barrera immediata entre el lumen i la làmina pròpia (Fig. 11). Aquestes cèl·lules estan altament organitzades i proporcionen una defensa eficaç contra nombrosos agents nocius que entren al lumen intestinal, el qual conté una gran varietat d'antígens peptídics solubles, macromolècules, electròlits i microorganismes. Les cèl·lules epitelials veïnes estan unides entre si per unions estretes que proporcionen una superfície gairebé impermeable (Fig. 12).

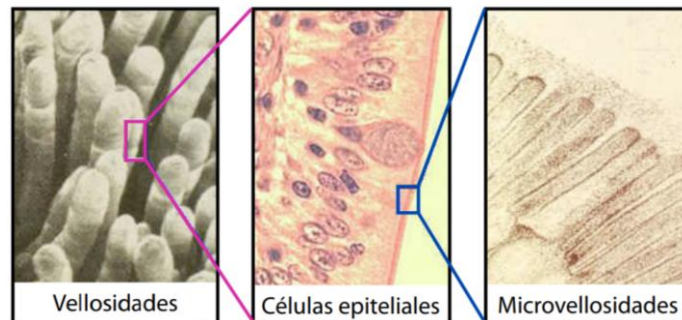


*Figura 11. Estructura del tracte gastrointestinal (Andrew, 2012).*

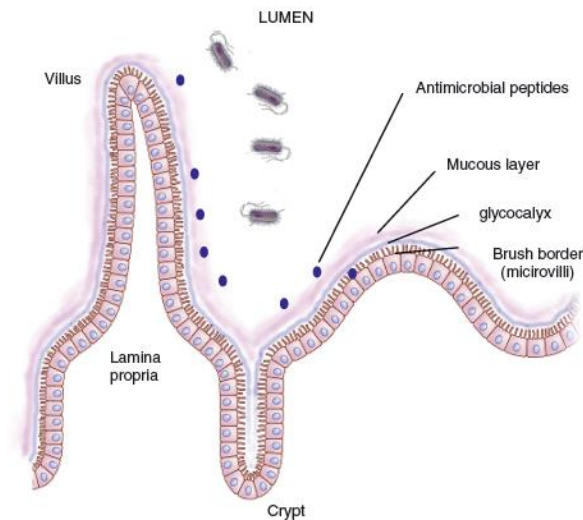


*Figura 12. Unió estreta de les cèl·lules epitelials (Andrew, 2012).*

Per l'altre, l'epiteli de l'intestí està plegat en moltes vellositats i cada cèl·lula epitelial posseeix microvellositats (Fig. 13) en la seva superfície luminal. Aquestes vellositats i microvellositats augmenten considerablement la superfície de l'intestí, la qual cosa ajuda en l'absorció de nutrients i estan recobertes per una capa de glicocàlix i de mucositat (Fig. 14), la qual evita que els bacteris nocius accedeixin a la membrana apical de les cèl·lules epitelials al romandre-hi atrapats i acaben expulsant-se del cos per l'acció peristàltica de la paret intestinal.

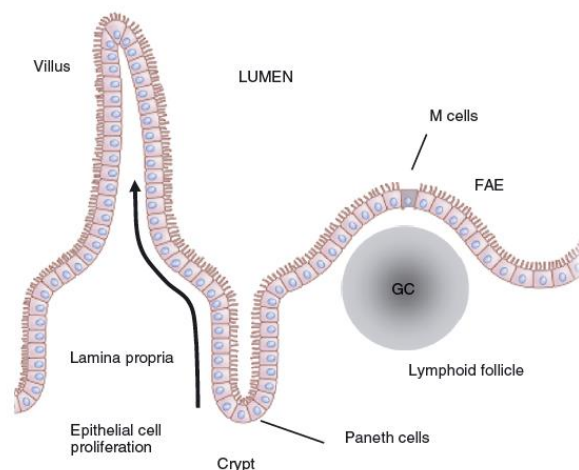


*Figura 13. Vellositats intestinals (Van, 2010).*



*Figura 14. La funció de barrera de la mucosa inclou una capa de glicocàlix i de mucositat en les microvellositats (Andrew, 2012).*

Les cèl·lules epitelials de l'intestí es reemplacen contínuament per cèl·lules noves que deriven de poblacions de cèl·lules mare ubicades a la part inferior de les criptes. A l'interior de les criptes intestinals es troben les cèl·lules Paneth (Fig. 15), les quals s'encarreguen de secretar peptidès antimicrobians a la llum intestinal. Els enteròcits morts es llancen des de la part superior de les vellositats i són constantment substituïts per cèl·lules noves de manera similar a una cinta transportadora.



*Figura 15. Superfície intestinal i unitat vellositat - cripta (Andrew, 2012).*

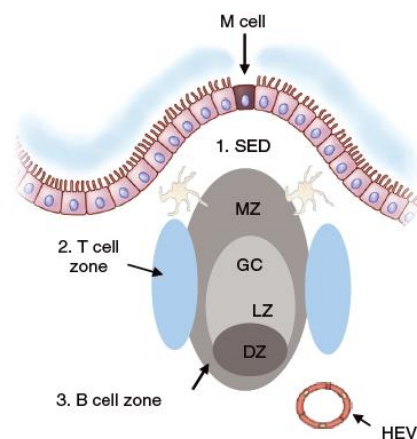
En aquest context, sota la capa de cèl·lules epitelials, coneguda com a Epiteli Associat al Fol·licle (FAE), es desenvolupen les Plaques de Peyer intestinals (PP), les quals actuen com a llocs inductius per a la iniciació de respostes immunes adaptatives. Aquest òrgan

limfoide secundari conté àrees especialitzades de divisió i diferenciació dels limfòcits T i B, i en particular s'encarreguen de produir IgA d'alta afinitat per cèl·lules plasmàtiques i indueixen les respostes de la cèl·lula T de memòria.

Cada PP es caracteritza per la presència de diversos fol·licles limfoides. El mateix FAE conté nombrosos limfòcits, coneguts com limfòcits intraepiteliais (IEL), que contenen principalment limfòcits T CD8+. L'àrea entre el fol·licle limfoide i la FAE s'anomena cúpula subepitelial i conté limfòcits T i B, cèl·lules dendrítiques (DC) i macròfags.

Les cèl·lules epitelials especialitzades, conegudes com a cèl·lules M, agafen els antígens del lumen intestinal i els transporten a través de l'epiteli per a la posterior captació i activació de les DC. Després de l'activació, les DC migren des de la FAE a la regió interfol·licular i presenten l'antigen a les cèl·lules T *helper* (Th), les quals són responsables de l'inici i desenvolupament o de la supressió de la majoria de les respostes immunitàries, mediatas per anticossos o cèl·lules, a través de l'alliberament de citocines (Gartner, 2017). Alternativament, migren als centres germinals dins de les regions fol·liculars de les PP i presenten els antígens a les cèl·lules B.

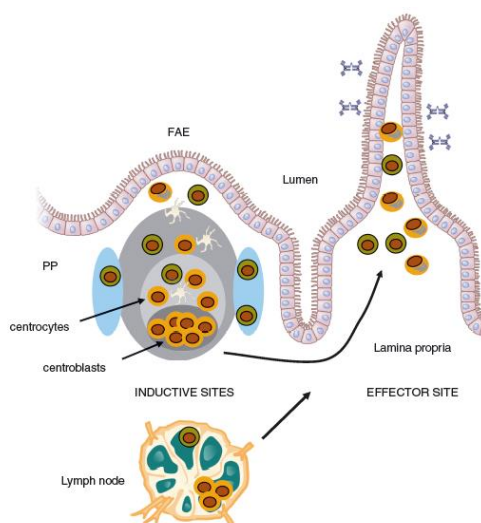
L'anatomia de les PP és molt similar a la dels nòduls limfàtics. L'estructura es pot dividir en tres grans àrees. 1. Àrea de captura d'antígens anomenada cúpula subepitelial (SED). 2. Una zona de cèl·lules T i 3. Una zona de cèl·lules B on les cèl·lules T, B i dendrítiques interactuen amb els centres germinals (GC) (Fig. 16).



*Figura 16. Microanatomia de les Plaques de Peyer (Andrew, 2012).*

Així doncs, les PP i els nòduls limfàtics regionals actuen com a llocs inductius, on s'inicien respostes immunològiques, mentre que la làmina pròpia actua com a lloc efector, on els limfòcits exerceixen les seves funcions efectores (Fig. 17). En els centres germinals de les PP (o ganglis limfàtics), es produeixen interaccions entre cèl·lules Th, cèl·lules dendrítiques fol·liculars i cèl·lules B immadures (centroscits). Les cèl·lules T

específiques d'antígens i les cèl·lules plasmàtiques surten del centre germinal i entren en llocs efectors, com la làmina pròpia.



*Figura 17. Anatomia de les PP i els nòduls limfàtics.*

Els subconjunts especialitzats de cèl·lules T existeixen al llarg del teixit limfoide associat a l'intestí (GALT), incloent una població de limfòcits intraepiteliais (IEL) que estan involucrats tant en l'homeòstasi com en la defensa de l'hoste (Andrew, 2012).

### 3.3. Citocines

Les citocines són proteïnes encarregades de regular les activitats cel·lulars implicades en la defensa de l'organisme. Es produeixen com a pro-molècules que han de ser activades per un enzim, la caspasa-1. Aquesta activació es estimulada pel complex proteic denominat inflamosoma, el qual es forma quan les molècules microbianes s'uneixen als Receptors de tipus Toll (TLR).

Les citocines i altres molècules que estimulen la inflamació (NOS2 i COX-2) són sintetitzades i secretades per macròfags, DC i mastòcits, immunitat innata, quan s'activen a través de la unió dels PAMP i les alarmines als seus Receptors de Reconeixement de Patrons (PRR) (Fig. 18). Això al mateix temps, inicia la immunitat adquirida (Tizard, 2009), ja que es generen limfòcits de memòria T i B, que romandran llestos per a dividir-se en cas d'haver-hi un altra exposició a aquest antigen o substància estranya particular, i cèl·lules efectores B i T, que duren a terme l'eliminació d'antígens i cèl·lules estranyes o alterades per l'antigen (Gartner, 2017).

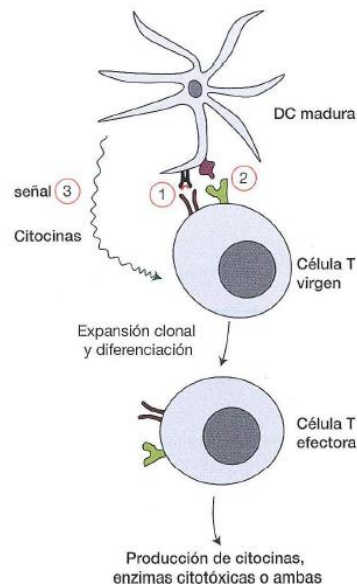


*Figura 18. Activació del sistema immune innat a través de la unió dels PAMP o les alarmines als PRR.*

Així doncs, actuen com a molècules missatgeres que poden comunicar senyals d'un tipus cel·lular a un altre, formant cascades de senyalització i, entre altres coses, poden induir a la cèl·lula per a rebre la senyal de proliferar, diferenciar-se, secretar altres citocines migrar o destruir-se.

Adicionalment, regulen l'amplitud i la duració de les respostes immunoinflamatòries per a què es produeixin de forma transitòria i estrictament associada amb la presència de material estrany o en resposta a senyals de perill endògens com els Patrons Moleculars Associats a Perill (DAMP); a més, d'intervenir en la reparació tissular (Roitt, 2013).

El perfil de citocines adoptat per una cèl·lula dendrítica activada té a veure amb els PAMP de l'agent infecciós i determinarà la funció de la cèl·lula T efectora (Fig. 19). Les cèl·lules T estan subdividides en limfòcits T: citotòxics, cooperadors (Th1, Th2 i Th17), de memòria i reguladors (Treg).



*Figura 19. Les cèl·lules dendrítiques presenten l'antigen i proporcionen senyals coestimuladores a les cèl·lules T que determinen la resposta de les cèl·lules T efectores (Roitt, 2013).*



En el nostre estudi ens interessen els limfòcits T cooperadors i reguladors, ja que són els que es troben involucrats en les respostes proinflamatòries i de tolerància. Algunes de les citocines involucrades són: IL-10 (Th2 i Treg), TGF- $\beta$  (Treg), IFN- $\gamma$  (Th1) i TNF- $\alpha$  (Th1 i Th17) (Fig. 20).

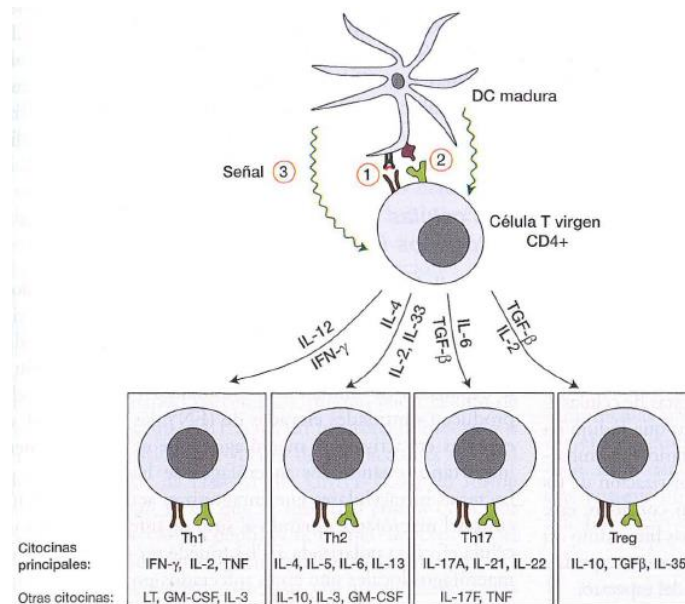


Figura 20. Les citocines produïdes per les DC o altres cèl·lules de la immunitat innata, determinen la diferenciació de la cèl·lula T (Roitt, 2013).

Les cèl·lules Th1 s'encarreguen de coordinar les respostes contra els patògens intracel·lulars, les Th2 les dels patògens extracel·lulars, les Th17 afavoreixen les respostes inflammatòries agudes i recluten neutròfils i les Treg s'ocupen de suprimir les cèl·lules T autoreactives i eviten el desenvolupament de malalties autoimmunes (Roitt, 2013).

### 3.3.1. Interleucina-10 (IL-10)

És una citocina amb propietats antiinflamatòries que són capaces d'inhibir la síntesis d'altres citocines proinflamatòries produïdes per l'activació dels limfòcits T helper de tipus 2 (Th2), cèl·lules dendrítiques, macròfags i cèl·lules assassines naturals (NK). Els limfòcits Treg i els macròfags M2 la produeixen en grans quantitats.

Entre altres funcions, pot alterar la capacitat de presentar antígens en les cèl·lules dendrítiques i els macròfags al disminuir l'expressió de molècules MHC II, la qual cosa estimula la producció de l'IL-1RA que és una citocina antiinflamatòria, i coestimuladores CD28, causant la inhibició de la síntesis de les citocines IL-1, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  pels limfòcits i de les IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$  pels macròfags.



Addicionalment, disminueix la producció de l'IFN- $\gamma$  i el TNF- $\alpha$  per les cèl·lules NK i inhibeix, les respostes Th1 i Th2 (Tizard, 2009).

### **3.3.2. Factor de creixement transformant beta (TGF- $\beta$ )**

Són una família de 5 glucoproteïnes, tres de les quals (TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 i  $\beta$ 3) es troben en els mamífers i dos (TGF- $\beta$ 4 i  $\beta$ 5) en els pollastres i les granotes. Es secreten en forma de molècula inactiva per activar-se posteriorment.

Són produïdes per plaquetes, macròfags activats, neutròfils i limfòcits T i B. Actuen sobre la majoria de tipus cel·lulars; per un costat, s'encarreguen de regular el creixement, la diferenciació i la funció de totes les classes de limfòcits, DC i macròfags i; per l'altre, inhibeixen la proliferació dels limfòcits T i B i estimulen la seva apoptosi, actuant eficaçment com una molècula immunosupressora.

Els limfòcits T apoptòtics alliberen TGF- $\beta$ , contribuint així a l'ambient supressor. Els limfòcits Th3, una subpoblació de limfòcits T CD4+, poden actuar com a cèl·lules reguladores, al secretar grans quantitats de TGF- $\beta$ , i juguen un paper rellevant en algunes formes de tolerància. A més, els TGF- $\beta$ , influeixen en la diferenciació de les subpoblacions Th: tendeixen a promoure les respostes Th1 i la producció de IL-2 en els limfòcits T verges, però també antagonitzen els efectes del IFN- $\gamma$  i IL-12 sobre les cèl·lules de memòria.

Els TGF- $\beta$  són necessaris per al desenvolupament òptim de DC i regulen la interacció entre les DC fol·liculars i els limfòcits B. Tanmateix, controlen el desenvolupament i la diferenciació d'aquests últims, inhibint la seva proliferació, induint la apoptosi i regulant el canvi de classe per a què produeixin IgA.

Els macròfags també produeixen TGF- $\beta$ , que regula les seves activitats, inhibint-los o estimulants-los, depenent de la presència d'altres citocines. D'aquesta manera, pot promoure l'expressió d'integrina, així com la fagocitosis pels monòcits sanguinis. D'altra banda, suprimeix l'esclat respiratori i la producció d'òxid nítric. Bloqueja la diferenciació dels monòcits a macròfags i els efectes citotòxics dels macròfags activats (Tizard, 2009).

### **3.3.3. Interferó gamma (IFN- $\gamma$ )**

És una glucoproteïna de 17 kDa produïda principalment pels limfòcits T helper de tipus 1 (Th1), pels limfòcits T citotòxics (Tc) i per les cèl·lules Natural Killer (NK) (Tizard, 2009).

La seva funció és proinflamatòria, ja que causa la quimiotaxis dels mastòcits i dels macròfags. Així doncs, entre les seves competències es troba l'activació dels macròfags tant en la resposta immunitària innata com en les respostes cel·lulars adaptatives, prèvia

reclutació dels monòcits de la circulació. A més d'inhibir la replicació viral, augmentar l'expressió de les molècules MHC I i II, induir el canvi en les immunoglobulines IgA i G2a (produïts pels limfòcits B), promoure la reparació tissular, antagonitzar algunes accions realitzades per la interleucina-4 (IL-4) i inhibir la multiplicació dels limfòcits Th2 (Roitt, 2013).

#### **3.3.4. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

És una proteïna trimèrica de 25 kDa produïda per macròfags, mastòcits, limfòcits T, cèl·lules endotelials, limfòcits B i fibroblastos. Es pot trobar soluble o unida a la membrana.

El TNF- $\alpha$  té un paper important en l'activació de la inflamació, ja que es alliberat en el moment en què els macròfags i els mastòcits detecten patògens invasors. Tanmateix, estimula l'alliberació local de quimioquines i altres citocines i promou l'adherència, la migració, l'atracció i l'activació de leucòcits al focus d'invasió. Posteriorment, facilita la transició d'immunitat innata a adquirida potenciant la presentació d'antígens i coestimulant als limfòcits T a través dels seus receptors i la substància neurotransmissora P.

Com implica la seva denominació, el TNF- $\alpha$  pot destruir algunes cèl·lules tumorals i cèl·lules infectades per virus mitjançant l'activació de les caspases i la inducció de la apoptosi (Tizard, 2009).

### **3.4. Efecte de la proteïna en el desenvolupament de la immunitat**

En un estudi es va observar que la nutrició té un profund efecte sobre la immunitat i la salut, ja que les deficiències nutricionals afecten a la capacitat de resposta immune i, per tant, augmenten la morbiditat i la mortalitat (Boon, 1995). Tanmateix, altres estudis han suggerit que la desnutrició durant les primeres etapes de vida podia perjudicar la maduració del sistema immunològic, danyant l'estat de salut permanentment (Frutos et al., 2018) i que la desnutrició severa de proteïna podia causar immunosupressió al endarrerir la reacció d'anticossos humerals (Gropp i Birzer, 1989). Això és degut a què la majoria dels mecanismes efectors del sistema immunitari són de naturalesa proteica i és probable que una infecció augmenti la demanda de proteïnes en els teixits gastrointestinals i en la síntesis de plasma (Bown et al., 1991). Les Igs, les citocines i les proteases dels mastòcits, també són de naturalesa proteica (Lewis i Austen, 1981; MacRae, 1993; Coop i Holmes, 1996).

Citant Trichet: “els nivells de proteïnes, àcids grassos, vitamines o microelements en una dieta poden afectar a la composició de la membrana de les cèl·lules immunitàries i la resposta inflamatòria” (Trichet, 2010). Cada cop hi ha més proves de què al menys alguns aspectes de la immunitat són sensibles als canvis en el subministrament de nutrients

(Coop i Holmes, 1996; Van Hourtert i Sykes, 1996; Coop i Kyriazakis, 1999, 2001). Es considera que és necessària una certa quantitat de proteïna metabolitzable (MP) per a muntar i mantenir una resposta immune efectiva. Per als remugants, la composició d'aminoàcids de MP encara és incerta i, en l'actualitat, només hi ha informació limitada disponible sobre la composició d'aminoàcids de les proteïnes involucrades en l'expressió de la immunitat. Per exemple, s'ha suggerit que les cèl·lules immunes tenen un requeriment relativament alt de glutamina (Calder, 1995) i de cisteïna i metionina (MacRae, 1993; Takahashi et al., 1997; Dröge i Breitskreutz, 2000). De la mateixa manera, es requereix d'una quantitat relativament gran de fenilalanina i triptòfan per a la resposta de proteïna de fase aguda que generalment s'associa en respostes a infeccions sistèmiques o traumes (Reeds et al., 1994). Tanmateix, diversos estudis suggereixen que un major subministrament de MP en la dieta pot reduir el recompte d'ous fecals (FEC) en ovelles parasitades (Donaldson et al., 1998; Kahn et al., 1999 i Houdijk et al., 2000).

Així doncs, basant-nos en aquests estudis, podem concloure que la proteïna és un component important de la formulació del pinso; donat a què, d'aquest depèn un correcte desenvolupament del sistema immunitari. No obstant això, es desconeix quin % de PB és més idoni en la composició del pinso de corders d'engreix. Els pinsos elaborats a Espanya tendeixen a incloure nivells de PB a l'alça, la qual cosa sobrealimenta a l'animal, generant pèrdues de N en forma d'emissions d'amoniac, i resulta una despesa innecessària en els costos d'alimentació per part del ramader. Per tant, establir un equilibri en aquest punt podria ser beneficiós per al ramader i per als animals.

En aquest estudi hem avaluat si la proporció de proteïna del pinso, es podria reduir lleugerament (2%), sense causar repercussions en el desenvolupament de la immunitat de les mucoses del tracte gastrointestinal dels corders. Les matèries primes que s'utilitzen en l'aportament de proteïna són una de les despeses més grans de la formulació del pinso i corroborar això ens permetria generar un ús més eficient dels recursos.

#### 4. Objectius

- L'objectiu general d'aquest projecte és determinar l'efecte de la reducció de proteïna bruta del pinso (20,4% vs. 18,3% i 19,1% vs. 17,4% PB, entre 14 – 19 kg i 19 – 25 kg de pes viu respectivament) en la fase de creixement i d'engreix sobre l'expressió de citocines proinflamàtores (IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ) i antiinflamàtores (IL-10 i TGF- $\beta$ ) en teixits de rumen i ili en corders de la raça autòctona Ripollesa.
- A més, s'inclourà el subobjectiu:
  - ❖ Caracteritzar el patró d'expressió de citocines proinflamàtores (IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ) i antiinflamàtores (IL-10 i TGF- $\beta$ ) en teixits de rumen i ili en corders d'engreix.

## 5. Material i mètodes

### 5.1. Animals de l'estudi

Durant l'experiment es van utilitzar 120 corders de la raça Ripollesa, tots ells eren mascles deslletats entre el dia 45 i 60 d'edat. Les seves mares havien estat vacunades front a l'enterotoxèmia 2 cops/ l'any amb una vacuna inactivada d'enterotoxèmia, tètanus i carboncle i desparasitades amb mebendazol i closantel sòdic dihidrat a la tardor i ivermectina a la primavera.

Els animals van allotjar-se en corrals d'1,04 m<sup>2</sup>/animal (3,3 m de llarg per 1,57 m d'ample) de les instal·lacions de BonArea Agrupa, el Nial.

Prèviament a l'experiment, els corders amb 12-14 kg de pes viu, havien estat alimentats durant una setmana amb un pinso que contenia un 18% de proteïna bruta.

### 5.2. Disseny experimental

En l'estudi, els corders van rebre una alimentació diferent en funció de la fase en la qual es trobaven: creixement (14 – 19 kg de pes viu) o engreix (19 – 25 kg de pes viu). La meitat (n = 60) es van sotmetre a un règim control de PB (20,4 % PB en creixement i 19,1 % PB en engreix) i l'altra meitat (n = 60) a un règim baix de PB (18,3 % PB en creixement i 17,4 % PB en engreix) (Annex 1). D'altra banda, però, només es van utilitzar 4 corders de cada grup per a fer el mostreig. L'experiment va durar 6 setmanes, 3 setmanes amb un pinso per a la fase de creixement i 3 setmanes amb un pinso per a la fase d'engreix.

Els pinsos eren isoenergètics (1 UFC/ kg), formulats amb els mateixos ingredients i additius, modificant únicament el % d'inclusió dels concentrats de proteïna vegetal (Annex 2). Tanmateix, l'alimentació dels corders era *ad libitum*.

Finalment, un cop els corders van assolir un pes viu de 19 - 25 kg, van ser traslladats a l'escorxador de BonArea Agrupa, per al posterior sacrifici i obtenció de les mostres de rumen i ili.

En el moment del sacrifici es van prendre mostres de rumen i d'ili de 8 corders alimentats amb diferents % de proteïna bruta en el pinso (grup control, n = 4 i grup tractament, n = 4).

### 5.3. Metodologia

En el moment del sacrifici, es van prendre mostres de rumen i ili de 8 corders que es van conservar en tubs que contenien 5 – 10 volums de *RNAlater* (Ambion) fins el moment de la seva extracció. El *RNAlater* és un reactiu que penetra a l'interior dels teixits

estabilitzant i protegint l'ARN cel·lular, mantenint la seva qualitat i quantitat, al mateix temps, que ens permet conservar les mostres durant molt de temps a -80 °C.

### 5.3.1. Homogeneïtzació de les mostres

Es va extreure una part del teixit de cada mostra i es va pesar independentment en tubs nous. Els tubs inicials es van mantenir amb el reactiu i es van congelar les mostres novament.

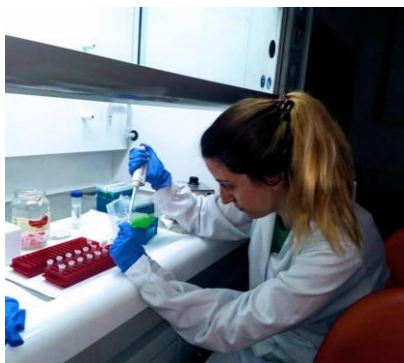
Es va afegir Trizol (*Invitrogen*) considerant el pes d'aquestes (1 ml per 50 - 100 mg) i es va triturar cadascuna d'elles amb un homogeneïtzador (Tekmar's tissumizer®). Posteriorment, es van traspasar 1.200 µl a tubs de 2 mL. Durant el procés, es van mantenir els tubs en gel a 4°C per a reduir la degradació de l'ARN.

### 5.3.2. Extracció d'ARN

L'objectiu d'utilitzar Trizol en l'apartat anterior va ser l'aïllament total de l'ARN dels teixits, ja que aquest reactiu trenca les cèl·lules i dissol els components cel·lulars mantenint la integritat de l'ARN. No obstant això, per tal d'afavorir la dissociació completa dels complexos de nucleoproteïnes, en van incubar les mostres homogeneïtzades 5 minuts a temperatura ambient (15 – 30°C).

Així doncs, un cop iniciat el procés d'extracció addicionant Trizol a les mostres, es va reprendre afegit 240 µl de cloroform (0,2 ml/ 1 ml Trizol) i es van agitar els tubs amb el vòrtex durant 15 segons. Posteriorment, es van incubar durant 2 - 3 minuts a temperatura ambient i, en acabar, es van centrifugar les mostres a 12.000 x g durant 15 minuts a 4°C. En aquest pas es separa la solució en dos fases, una orgànica i l'altra aquosa, en aquesta última es troba l'ARN i el 60% conté Trizol.

A continuació, es va recuperar la fase aquosa de les mostres pipetejant amb cura per a evitar generar turbulències i aconseguir una extracció més neta de la fase (Fig. 21) i es van traslladar en tubs d'1,5 ml.



*Figura 21. Recuperació de la fase aquosa.*

Tanmateix, es van afegir 600  $\mu\text{l}$  d'isopropanol (0,5 ml/ 1 ml de Trizol), per tal de precipitar l'ARN i poder-lo recuperar de la fase aquosa, i 2  $\mu\text{l}$  de *Glycoblue* (Invitrogen), coprecipitant que tenyeix l'ADN. Seguidament, es van deixar incubar les mostres a temperatura ambient durant 10 minuts i després es van centrifugar a 12.000 x g durant 15 minuts a 4°C.

En l'anterior pas, l'ARN va precipitar formant un pellet que es va adherir formant un botó a la base del tub, això ens ha facilitat poder desfer-nos de la part aquosa sense eliminar l'ARN, el qual era visible degut al *Glycoblue*. Després es van afegir 1.200  $\mu\text{l}$  d'etanol 75% (1 ml/ 1 ml de Trizol) per a netejar el pellet, es va mesclar bé amb el vòrtex i es va centrifugar a 7.500 x g durant 10 minuts a 4°C.

Un cop finalitzat l'anterior procés, es van retirar les restes d'etanol i es van deixar assecar els pellets d'ARN durant 10 minuts fins que no quedaven restes d'etanol. Llavors, es va resuspendre el pellet amb 70  $\mu\text{l}$  d'aigua lliure de RNases a 60°C.

Un cop finalitzada l'extracció, es van prendre 3  $\mu\text{l}$  de cada mostra per a poder quantificar i veure la qualitat de l'ARN. Posteriorment, les mostres es van conservar a -80°C.

Val a dir que durant tots els passos anteriors es van mantenir els tubs en gel a 4°C per a reduir la degradació de l'ARN.

### **5.3.3. Avaluació de la qualitat i quantitat de l'ARN**

En aquest apartat es pretenia conèixer la puresa de l'ARN i la seva concentració. La quantificació es realitza per espectrofotometria i l'aparell que s'encarrega d'aquest anàlisi és el NanoDrop (*Thermoscientific*) (Fig. 22). Abans de començar a analitzar les mostres s'ha de fer un "blank" i verificar que no hi ha restes d'ARN entre mostra i mostra.



Figura 22. NanoDrop (Thermoscientific).

Algunes de les dades que ens aporta el software són l'absorbància i la concentració de l'ARN. Una relació d'absorbància A260/A280 d'entre 1'8 i 2'0 ens indicarà que la puresa de l'ARN és acceptable. Un rati apreciablement més baix ens estaria indicant la presència de proteïnes, fenols o altres contaminants que s'absorbeixen a 280 nm (Thermo Fisher Scientific, 2009).

#### 5.3.4. Transcripció Reversa

L'objectiu d'aquesta tècnica era obtenir una cadena d'ADN complementaria (ADNc) al nostre ARN, ja que la PCR només treballa amb molècules d'ADN. Per això, l'enzim transcriptasa reversa, va construir una cadena nova d'ADN utilitzant l'ARN de les nostres mostres com a motlle.

En primer lloc, es va calcular el volum d'ARN necessari per a transcriure 1 µg d'ARN en la reacció. Un cop es van conèixer les concentracions d'ARN per a cada mostra, es van calcular els volums necessaris per a realitzar el tractament de DNases per a 1 µg d'ARN. Tot seguit, es va calcular el volum d'aigua depc (dietil pirocarbonat) que és un inhibidor d'ARNases per a 12 µl. Es van descongelar els reactius en gel i es varen realitzar les reaccions seguint les recomanacions indicades pel fabricant (Taula 4). La *Desoxyribonuclease I* (Rnase-free) (Thermoscientific) és una endonucleasa que s'encarrega de digerir les cadenes simples i dobles d'ADN. D'aquesta manera, eliminem la possible presència d'ADN genòmic que hagi pogut quedar i evitar que la qPCR ens repliqui gens que no s'estiguin expressant. L'activitat d'aquest enzim és estrictament dependent d'un tampó amb *MgCl* que li aporta els ions necessaris per a què l'enzim treballi. Finalment, l'enzim inhibidor de l'activitat ARNasa, *Ribolock* (Thermoscientific), inhibeix l'activitat de les ARNases protegint així el nostre ARN de la degradació d'aquests enzims.

*Taula 4. Preparació dels reactius per a la RT en funció de les recomanacions del fabricant.*

<i><b>Reactiu</b></i>	<i><b>Volum (<math>\mu</math>L per mostra)</b></i>
<i>ARN (mostra)</i>	1 $\mu$ g
<i>Aigua DEPC</i>	Fins a 12 $\mu$ l
<i>10X Buffer with MgCl</i>	1,2
<i>Desoxyribonuclease I</i>	1
<i>Ribolock</i>	0,5
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>

Posteriorment, es van incubar les mostres 30 minuts a 37 °C en un termociclador (Fig. 23) i després es van posar en gel a 4 °C.



*Figura 23. Termociclador i centrifugadora.*

Un cop va transcórrer aquest període de temps, es va afegir 1  $\mu$ l d'EDTA directament als tubs, aquests es van centrifugar, es van posar a incubar 10 minuts a 65°C i després es van refredar en gel a 4°C. L'EDTA és un agent quelant que evita la hidròlisi de l'ARN en cations divalents durant la seva incubació, protegint-lo així de la seva degradació.

L'ARN obtingut es va utilitzar com a motlle per a la transcripció reversa. En la reacció de transcripció es van incloure mostres de control negatiu de la retrotranscripció, a les quals no se'ls va afegir l'enzim per a verificar que no teníem contaminació d'ADN genòmic, ja que sense l'enzim no es pot replicar l'ARN a ADNc. A més es va incloure un control negatiu en el qual el volum d'ARN es va substituir per aigua per a controlar possibles contaminacions en els reactius utilitzats en la retrotranscripció.

Al tractat amb DNases se li van afegir *Random primers*, dNTPs i aigua depc fins aconseguir un volum de 15,5  $\mu$ l (Taula 5). Els encebadors s'uneixen a qualsevol fragment d'ARN per a replicar-lo i els nucleòtids són utilitzats per a construir la molècula de



ADNc. Les mostres es van incubar durant 5 minuts a 65°C i després es van refredar en gel a 4°C.

Finalment, es va afegir l'enzim *RevertAid* (*Thermoscientific*) i un tampó adequat per a l'enzim (5X RT Buffer) (Taula 5) fins aconseguir un volum total de 20 µl. L'enzim és el que s'encarrega de construir la cadena d'ADN còpia (ADNc) a partir de les mostres d'ARN i el buffer li concedeix les condicions òptimes per a què treballi correctament. Posteriorment, es van centrifugar els tubs, es van posar a incubar 10 minuts a 25°C, 30 minuts a 50°C i 5 minuts a 85°C. Després es van refredar en gel a 4°C i es van congelar i emmagatzemar al refrigerador.

*Taula 5. Preparació dels reactius per a la transcripció reversa (RT) en funció de les recomanacions del fabricant.*

<i>Reactiu</i>	<i>Volum (µL per mostra)</i>
<i>ARN tractat amb ADNases</i>	13 µl
<i>Random Primers</i>	1
dNTPs	1
<i>Aigua DEPC</i>	0,5
<i>5X RT Buffer</i>	4
<i>RevertAid</i>	0,5
<b>TOTAL</b>	<b>20</b>

### 5.3.5. PCR a temps real

Un cop vam obtenir l'ADNc del ARNm, vam procedir a realitzar una PCR quantitativa (qPCR) o a temps real, aquesta tècnica és una variant de la PCR que és la reacció en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*). És la més sensible per a la detecció d'àcids nucleics (ADN i ARN) i s'utilitza per amplificar al mateix temps que quantifica de forma absoluta el producte de l'amplificació d'àcid desoxiribonucleic (ADN).

Així doncs, es basa en l'amplificació de milions de còpies d'una regió específica d'ADN i, en el nostre estudi, es va emprar per a determinar l'expressió de dos citocines proinflamatòries (IFN-γ i TNF-α) i dos citocines antiinflamatòries (IL-10 i TGF-β) en els teixits de rumen i ili i els gens de referència ACTB (el gen de la beta actina) i GAPDH (el gen del gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa) (Taula 6). Aquests dos últims són *housekeeping* o gens de referència, els quals són gens que s'expressen en la major part de

les cèl·lules donat a què són necessaris per al manteniment de les seves funcions basals, essencials per a l'existència de la cèl·lula, independentment del seu paper específic en el teixit o l'organisme. S'utilitzen com a controls interns d'estudis experimentals i serveixen per a millorar la fiabilitat de l'experiment RT-PCR relatiu, ja que permet corregir variacions d'eficiència i errors en la quantificació de la mostra (Pampel, 2017). En aquest cas vam emprar dos gens de referència perquè es considera que els controls endògens poden variar considerablement entre els teixits i ens permet tenir en compte qualsevol impacte que pugui tenir una condició experimental sobre l'expressió d'un gen *housekeeping* habitual.

El disseny dels *primers* es va realitzar per a què cada seqüència es trobés en un exó diferent de manera que s'expandís un intró i només s'amplifiqués ADNc i no ADN genòmic.

*Taula 6. Seqüències i referència dels primers utilitzats per a la qPCR.*

<b><i>Gene</i></b>		<b><i>Sequence (5'-3')</i></b>	<b><i>Reference</i></b>
<b><i>ACTB</i></b>	Fwd	CTGGACTTCGAGCAGGAGAT	Puech et al., 2015
	Rev	GATGTCGACGTCACACTTC	
<b><i>GAPDH</i></b>	Fwd	CCTGGAGAAACCTGCCAAGT	Menzies i Inghan, 2006
	Rev	GCCAAATTCATTGTCGTACCA	
<b><i>IFN-<math>\gamma</math></i></b>	Fwd	CAGAGCCAAATTGTCTCCTTC	Puech et al., 2015
	Rev	ATCCACCGGAATTTGAATCAG	
<b><i>TNF-<math>\alpha</math></i></b>	Fwd	CAAATAACAAGCCGGTAGCC	Primer3plus
	Rev	TGGTTGTCTTCAGCTCCAC	
<b><i>IL-10</i></b>	Fwd	TTAAGGGTTACCTGGGTTGC	Primer3plus
	Rev	TTCACGTGCTCCTTGATGTC	
<b><i>TGF-<math>\beta</math></i></b>	Fwd	TTGACGTCACCTGGAGTTGTG	Primer3plus
	Rev	CGTTGATGTCCACTTGAAGC	

De cada *primer* es va calcular la seva eficiència d'amplificació (un augment del número d'amplificacions per cicle), tant els *primers* com la concentració de ADNc han d'optimitzar-se per a diferents gens diana. Es va generar una corba estàndard usant una sèrie de mostres de ADNc diluïdes; en aquest cas, 5 dilucions seriades amb un factor de dilució 1:10, i una reacció control usant només aigua. L'eficiència d'amplificació de la

qPCR es va calcular a partir de la pendent de la gràfica dels valors de C<sub>q</sub> (Annex 3, 4, 5, 6, 7 i 8); és a dir, del cicle de quantificació que és el número de cicles necessaris per a què la senyal de fluorescència exerceixi la fluorescència de fons, representats en funció del registre d'entrada d'ADNc (eficiència=  $(10^{-1/\text{pendent}} - 1) \times 100$ ). Això, al mateix temps, ens va permetre comprovar que hi havia una relació lineal entre la quantitat de partida de ADNc i la quantificació de la qPCR en els valors C<sub>p</sub>, descartant així diferències en l'expressió dels gens degudes en realitat a diferències en les eficiències dels diferents processos de la qPCR. Per a què les corbes d'eficiència s'acceptin com a bones (Taula 7), aquestes tenen que ser lineals com a mínim en quatre punts, han de tenir una R<sup>2</sup> (valor de qualitat de la corba) de > 0,96 i uns valors d'eficiència propers al 100% (entre 90% i 110% es consideren acceptables). Els gens de referència i diana han de tenir una eficiència d'amplificació similar.

*Taula 7. Resultats de les corbes d'eficiència.*

<b>GEN</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>% d'eficiència</b>
<i>ACTB</i>	0,99	94,80
<i>GAPDH</i>	0,99	90,22
<i>IFN-γ</i>	0,95	107,94
<i>TNF-α</i>	0,97	96,61
<i>IL-10</i>	0,99	96,34
<i>TGF-β</i>	0,99	104,21

Per a la realització de les reaccions de qPCR, es van dissenyar les plaques per a determinar la disposició de cadascuna de les mostres i es varen realitzar els càlculs per a conèixer el volum dels reactius de la màster mix (aigua milli-Q® lliure de RNases, SYBR Green® per a mesurar l'acumulació de la mostra amplificada durant cada cicle mitjançant fluorescència i primers específics del gen en qüestió *Forward and Reverse*). D'altra banda, es van diluir els ADNc a 1:30 per a dur a terme la reacció. Finalment cada pouet dissenyat de la placa contenia 5 µl de màster mix i 3 µl d'ADNc (Taula 8).

Tanmateix, de cada mostra es varen realitzar 3 replicues per a evitar possibles problemes associats al pipeteig i verificar que el procés s'havia dut a terme correctament. A més, en cada placa es van afegir els controls negatiu amb aigua, negatiu sense transcriptasa reversa i positiu amb un *pool* de totes les mostres. Tot seguit es varen segellar les plaques amb film de plàstic de qualitat òptica i es varen centrifugar breument per a eliminar les bombolles d'aire formades durant la dispensació dels líquids.

Taula 8. Reactius utilitzats en la qPCR.

<i>Reactiu</i>	<i>Rang</i>
<i>Aigua ultrapura</i>	2 µl
<i>DNA pol màster</i>	2,5 µl
<i>Primer mix (F+R)</i> <i>200 – 600 µM</i>	0,5
<i>ADNc (1:30)</i>	3 µl
<b>Volum final</b>	<b>8 µl</b>

Finalment, cadascuna de les plaques es va posar a incubar en un termociclador (Fig. 24), ABI PRISM™ 7500 (Applied Biosystem), el qual s'encarregava d'escalfar i refredar les plaques en 3 temperatures i temps diferents (Fig. 25), repetint-se aquest procés durant 40 cicles.



Figura 24. Termociclador per a PCR.

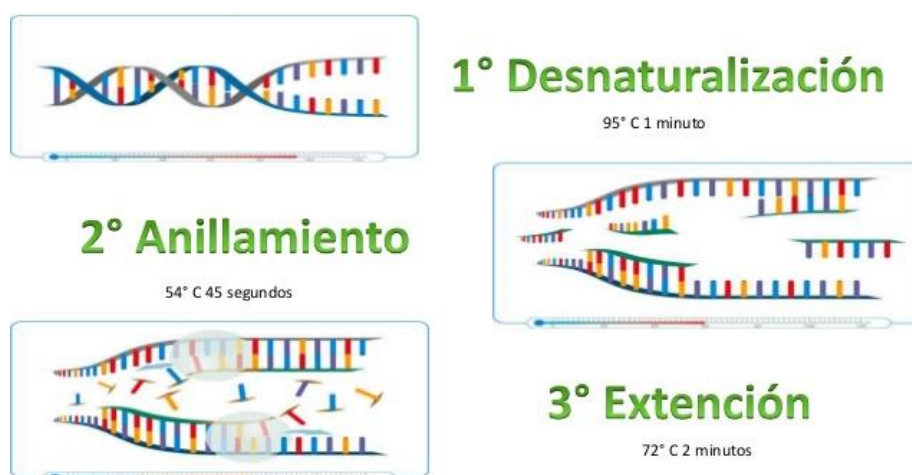


Figura 25. Fases de la PCR.

Posteriorment, es va dur a terme la normalització, coneguda també com a mètode Cq comparatiu, aquesta es realitza amb la mitjana geomètrica dels gens de referència establiment expressats com a controls interns (ACTB i GAPDH en el nostre cas). A més es va considerar el control positiu com a mostra “calibradora”. La seva funció és corregir les variacions en múltiples passos (purificació de l’ARN, avaluació de la concentració d’ARN i RT i l’eficiència d’amplificació). La informació d’aquests dos gens es combina per a mesurar el nivell d’expressió relativa del gen. La fórmula emprada per a quantificar l’expressió dels gens és:

$$RQ = \frac{2^{\Delta Ct \text{ gen (calibrador-mostra)}}}{2^{\Delta Ct \text{ endogen (calibrador-mostra)}}}$$

El resultat ens va permetre realitzar comparacions entre mostres.

#### 5.4. Anàlisi estadístic

Per a cada animal es van registrar les següents dades: pes al sacrifici, tractament (control vs baix % de PB) i l’expressió dels gens ACTB, GAPDH, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 i TGF- $\beta$ .

Les dades normalitzades de les citocines es van tractar amb un test estadístic paramètric, el test t de *Student*, més concretament la prova t de mostres independents, ja que aquesta s’utilitza quan s’obtenen dos grups de mostres aleatòries, independents i idènticament distribuïdes a partir de dos poblacions a ser comparades. En el nostre cas, teníem 4 subjectes per al grup de tractament i 4 subjectes per al grup de control. L’objectiu de la prova es basava en avaluar si hi havia una diferència estadísticament significativa ( $P < 0,05$ ) entre les mitjanes d’aquests dos grups dintre d’una mateixa variable dependent (l’expressió de cadascuna de les citocines en dos teixits i grups diferents) i contrastar la hipòtesis nul·la. El programa estadístic utilitzat ha estat el JMP® Trial 14.3.0. (SAS Institute Inc, Cary, NC, EEUU).

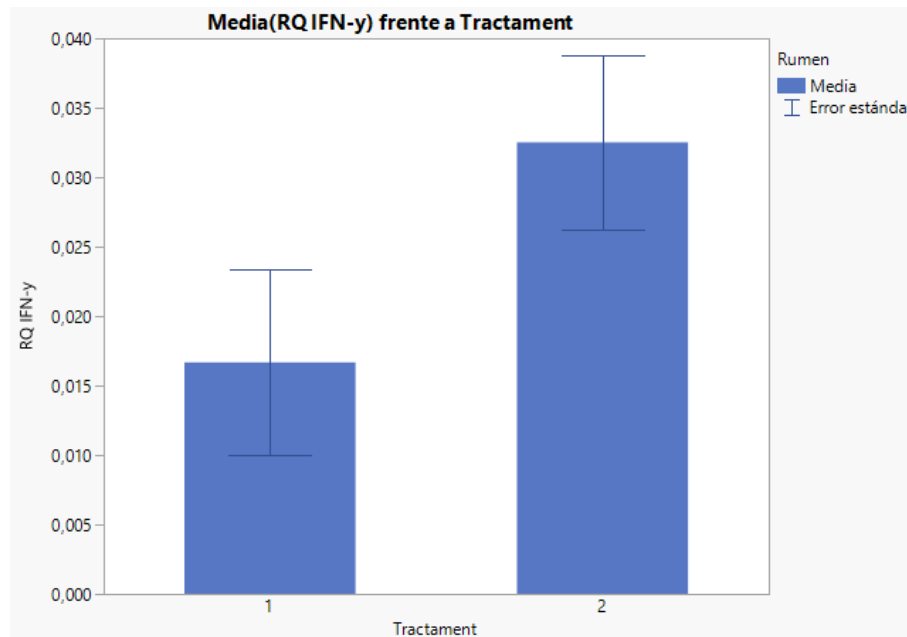
### 6. Resultats

En l’anàlisi estadístic s’ha utilitzat la prova t de *student* per a mostres independents. L’objectiu ha estat comparar dos tractaments amb diferent % de proteïna bruta en el pinso (variables categòriques) en dos grups de corders per a valorar si hi ha diferències estadísticament significatives ( $P < 0,05$ ) en l’expressió de citocines proinflamàtores i antiinflamàtores (variables quantitatives) en els teixits d’ili i rumen.

A continuació, es poden apreciar els resultats per a cadascuna de les citocines en cada teixit normalitzades en funció del tipus de tractament. El tractament 1, equival al grup control (alimentat primer en un 20,4% de PB en el pinso i després en un 19,1%) i, el tractament 2, al grup que es tracta en l’estudi (alimentat primer amb un 18,3% de PB en el pinso i després en un 17,4%).

Les dades del rumen de l'animal 12 s'han hagut d'eliminar de l'anàlisi, ja que va haver un incident amb el volum original de la RT+ i s'ha eliminat de l'estudi.

En primer lloc, s'ha estudiat la citocina IFN- $\gamma$  (Fig. 26 i 27) i hem vist que no mostrava diferències significatives amb el tractament en els teixits de rumen ( $P > 0,14$ ) (Tractament 1=  $0,01 \pm 0,01$  i Tractament 2=  $0,03 \pm 0,01$ ) i ili ( $P > 0,57$ ) (Tractament 1=  $0,06 \pm 0,05$  i Tractament 2=  $0,09 \pm 0,04$ ) (mitjana $\pm$ desviació estàndard) (Annex 9 i 10).



*Figura 26. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) d'IFN- $\gamma$  en rumen front al tipus de tractament.*

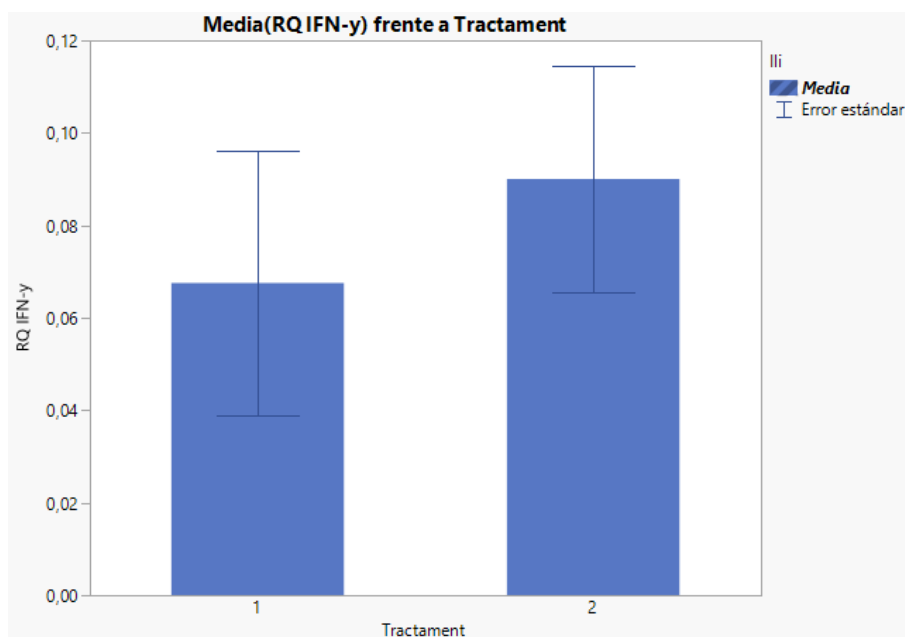


Figura 27. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) d'IFN- $\gamma$  en ili front al tipus de tractament.

Posteriorment, hem avaluat la citocina TNF- $\alpha$  (Fig. 28 i 29), la qual no mostrava diferències significatives amb el tractament en els teixits de rumen ( $P > 0,82$ ) (Tractament 1=  $0,48 \pm 0,37$  i Tractament 2=  $0,54 \pm 0,16$ ) i ili ( $P > 0,13$ ) (Tractament 1=  $1,89 \pm 0,39$  i Tractament 2=  $1,45 \pm 0,31$ ) (Annex 11 i 12).

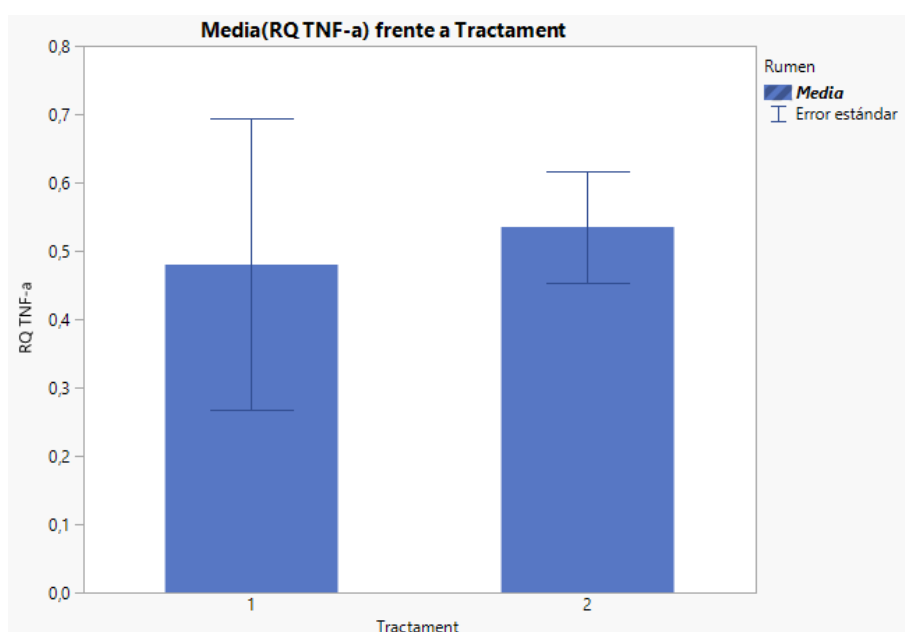


Figura 28. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) de TNF- $\alpha$  en rumen front al tipus de tractament.

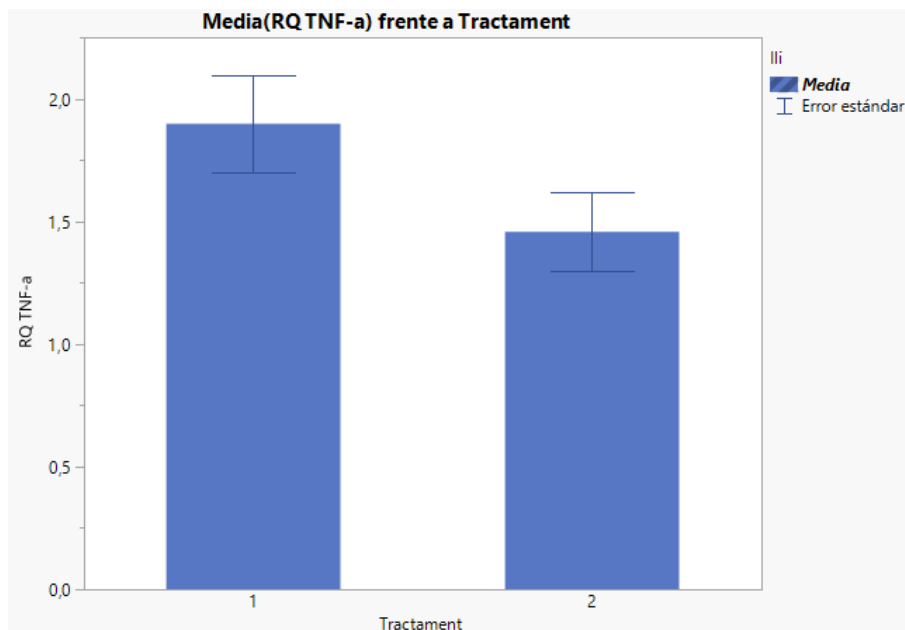


Figura 29. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) de TNF- $\alpha$  en ili front al tipus de tractament.

Tot seguit, hem analitzat la citocina IL-10 (Fig. 30 i 31) i hem vist que no presentava diferències significatives en la seva expressió en rumen, ( $P > 0,31$ ), (Tractament 1=  $1,17 \pm 0,78$  i Tractament 2=  $0,57 \pm 0,23$ ) i ili, ( $P > 0,74$ ), (Tractament 1=  $3,55 \pm 2,00$  i Tractament 2=  $3,94 \pm 0,95$ ) en funció del tractament (Annex 13 i 14).

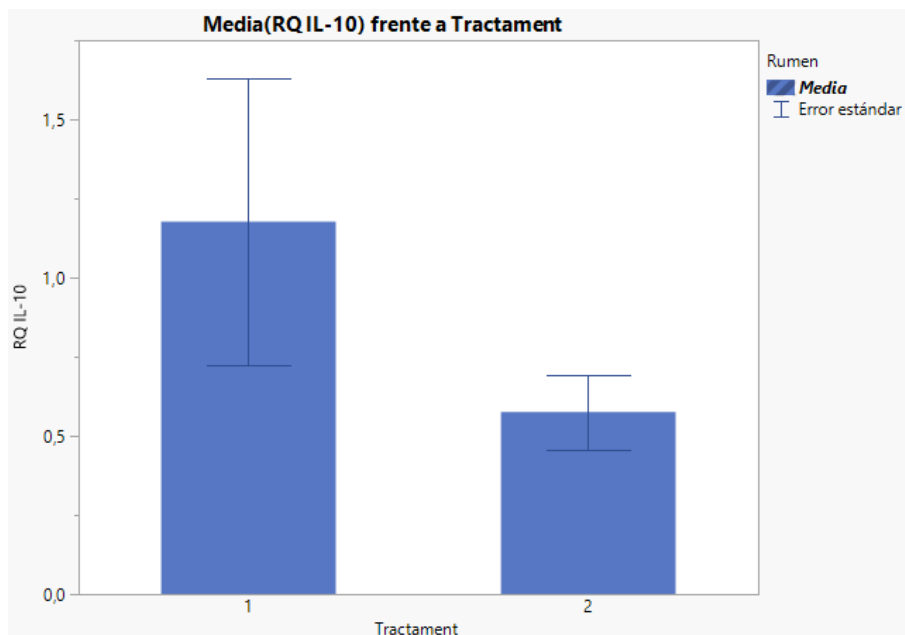
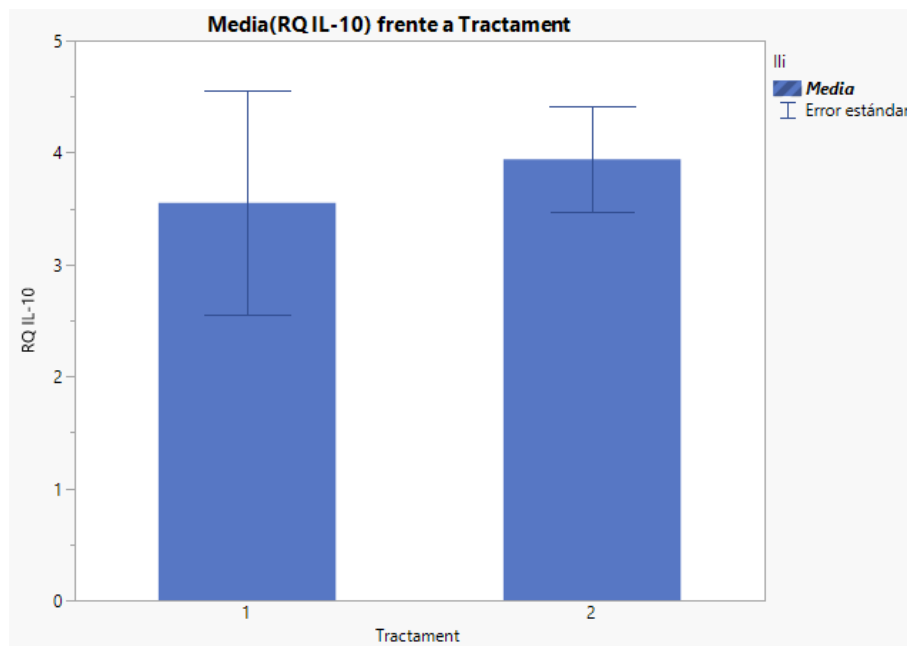


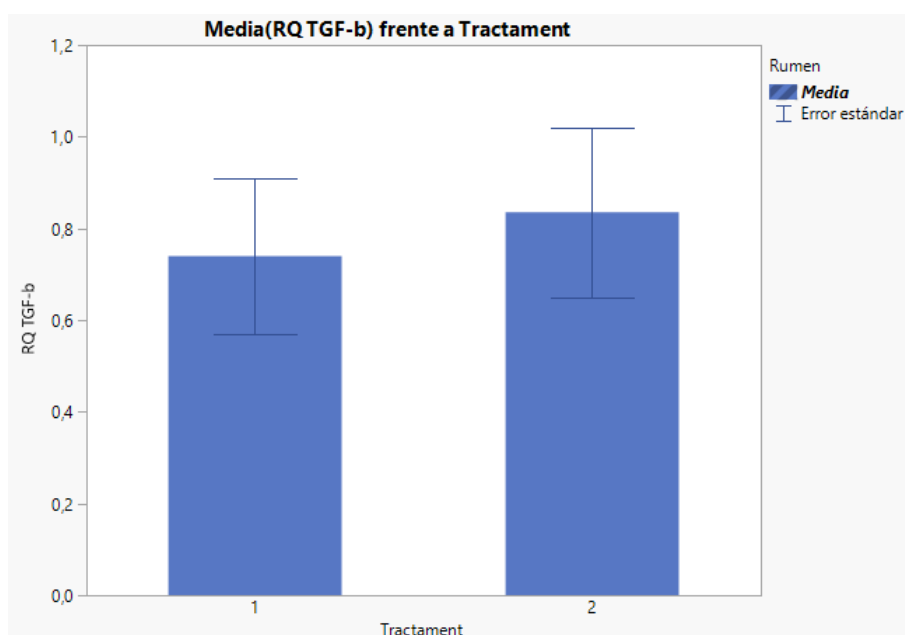
Figura 30. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) d'IL-10 en rumen front al tipus de tractament.





*Figura 31. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) d'IL-10 en ili front al tipus de tractament.*

Pel que fa a la citocina TGF- $\beta$  (Fig. 32 i 33), tampoc s'han observat diferències estadísticament significatives en la seva expressió en rumen, ( $P > 0,72$ ), (Tractament 1=  $0,74 \pm 0,29$  i Tractament 2=  $0,83 \pm 0,36$ ), i ili ( $P > 0,85$ ) (Tractament 1=  $2,86 \pm 1,7$  i Tractament 2=  $3,21 \pm 3,07$ ), en funció del tipus de tractament (Annex 15 i 16).



*Figura 32. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) de TGF- $\beta$  en rumen front al tipus de tractament.*

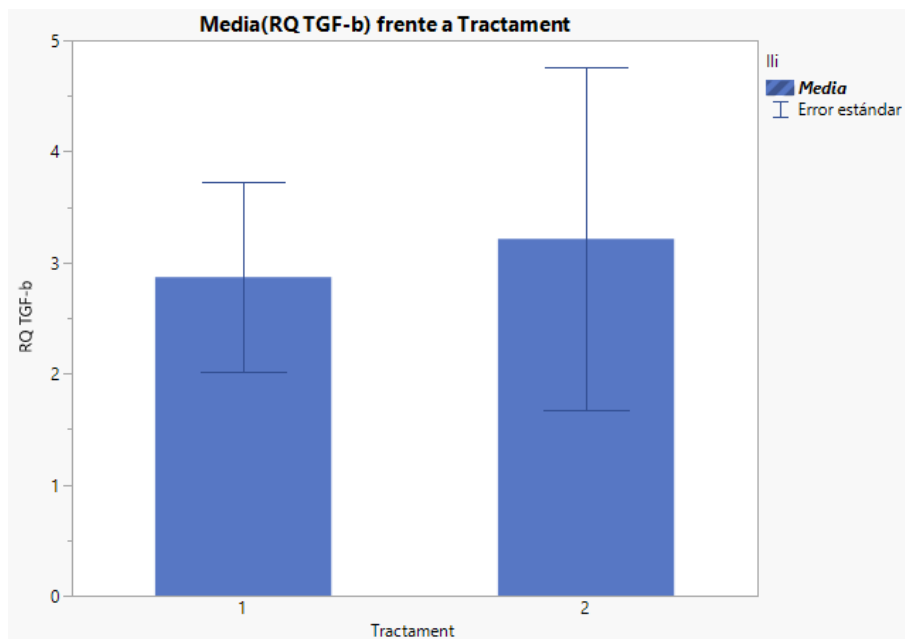


Figura 33. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) de TGF- $\beta$  en ili front al tipus de tractament.

Tanmateix, si analitzem l'expressió de les citocines en el rumen i l'ili (Fig. 34 i 35), veiem que la citocina més expressada en ambdós teixits, és la IL-10, seguida de la TGF- $\beta$ . És a dir, predomina l'expressió de les citocines antiinflamatòries, la qual cosa ens indica que hi ha una tolerància immunitària i que el canvi del % de PB en el pinso no ha desencadenat una reacció immunitària.

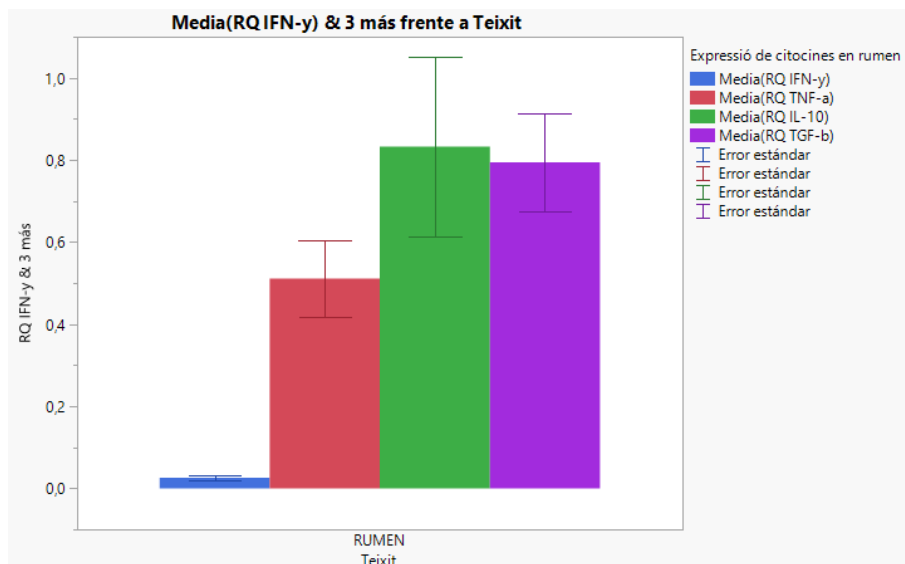


Figura 34. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) de les citocines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 i TGF- $\beta$  en rumen.

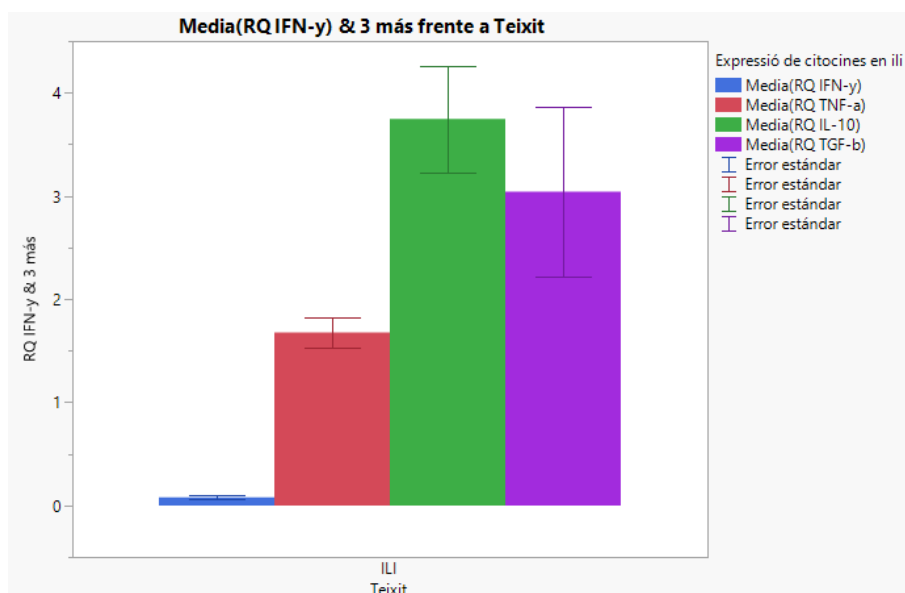


Figura 35. Mitjana i error estàndard de valors de quantificació relativa (RQ) de les citocines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 i TGF- $\beta$  en ili.

Així doncs, els resultats d'aquest estudi determinen que aparentment no sembla haver-hi diferències significatives entre els dos tipus de tractament sobre l'expressió de les citocines proinflamatòries i antiinflamatòries en el rumen i l'ili dels corders. És a dir, seria indiferent el tipus de pinso utilitzat durant l'engreix dels corders; donat a què, el resultat sobre l'expressió immunitària seria el mateix. A més, aquests resultats es veuen recolzats per la comparació entre pes viu al sacrifici i el tipus de tractament (Fig. 36), ja que tampoc s'aprecien diferències significatives ( $P > 0,08$ ) (Tractament 1 =  $24,62 \pm 0,39$  i Tractament 2 =  $25,31 \pm 0,51$ ) (Annex 17).

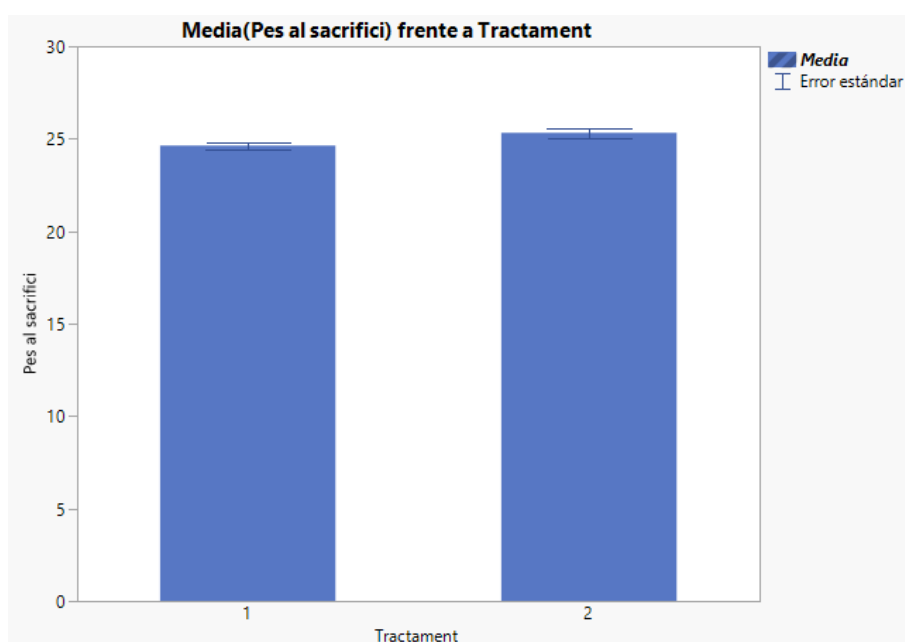


Figura 36. Mitjana i error estàndard del pes al sacrifici front al tipus de tractament.

## 7. Discussió

L'objectiu de l'estudi pretenia determinar si la reducció de proteïna bruta del pinso afectava a l'expressió immunològica en l'aparell digestiu, concretament en l'ili i el rumen, en corders de la raça Ripollesa. Els resultats ens han revelat que no sembla haver-hi ninguna diferència significativa entre els dos tipus de tractaments emprats i l'expressió de les citocines estudiades (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 i TGF- $\beta$ ).

Les dietes baixes en proteïna s'han relacionat amb estats d'estrès oxidatiu (EO), que s'associa en la formació de radicals lliures i citocines proinflamatòries, la qual cosa provoca danys en la mucosa intestinal. D'altra banda, segons Zhang: "l'estrès al deslletament pot induir alteracions en el sistema immunitari dels corders, un efecte de resposta inflamatòria a llarg termini es pot evidenciar pels canvis en les citocines hematològiques i proinflamatòries" (Zhang et al., 2018). Les funcions immunitàries tradicionalment s'han considerat com a part dels requisits de manteniment, però s'ha suggerit que la immunitat és sensible al subministrament de nutrients (Galyean et al., 1999). Així doncs, en relació amb el tipus de resposta immune, l'escassetat de proteïnes pareix afectar les defenses no específiques i la immunitat cel·lular en major mesura que la immunitat humoral (Calder i Jackson, 2000). L'expressió gènica de citocines són utilitzades com a indicadors de salut ruminal i intestinal amb la qual cosa, en aquest estudi, podem suposar que amb el tipus de tractaments aplicats no s'altera l'equilibri entre els mecanismes immunitaris de defensa i la tolerància del tracte gastrointestinal al no causar un estat de subnutrició proteica amb la consegüent sobreexpressió de citocines proinflamatòries.

Existeix poca investigació en l'àrea de les necessitats proteiques de les races espanyoles utilitzades en la producció de carn amb la qual cosa, les dietes proteiques a Espanya tendeixen a excedir les necessitats nutricionals dels corders d'engreix (Alvarez et al., 2018). Citant a Bello: "les empreses espanyoles incorporen un ampli rang de contingut de PB (15 - 20,4% PB sobre matèria seca en el concentrat dels corders d'engreix" (Bello et al., 2016). FEDNA (2008) va estimar que les necessitats dels corders de races autòctones de 15 – 24 kg són de 15,6% de PB, les normes NRC (2007) d'oví van determinar que, en races de maduresa precoç, les necessitats de PB oscil·laven entre 11,7-12,8% i INRA (2008) estimava que un corder entre els 15 i els 25 kg de pes viu tenia unes necessitats d'entre 16,2% i 15,1% de PB; per tant, cenyint-nos als nostres resultats, podem dir que els % de PB emprats en l'experiment no s'allunyaven de les recomanacions nutricionals de FEDNA i INRA, amb la qual cosa podem reafirmar-les i afegir que no hi han repercussions a nivell d'expressió immunitària. Tanmateix, altres estudis han avaluat l'efecte del % de PB sobre altres paràmetres. Aquests han suggerit que no hi ha diferències significatives en el pes viu (PV) dels corders en la fase de creixement i la d'engreix. De la mateixa manera, el nivell de proteïna no sembla afectar al guany mig diari (GMD) (Pelegrin et al., 2019). En races rústiques de Túnez, es va observar que l'ús de pinsos baixos en PB (11% PB sobre MS) per a corders menors de 44 kg no afectava als seus paràmetres productius, promovent les mateixes taxes de creixement que els alimentats amb nivells de proteïna més alts i millorant així la rendibilitat de l'explotació

(Hajji et al., 2016). D'altra banda, la reducció del nivell de PB en el pinso de creixement i d'engreix no va afectar al consum mig diari (CMD), ni al PV al sacrifici, ni al rendiment de la canal (Pelegrin et al., 2019). De la mateixa manera, Hajji et al., (2016) van suggerir, que en corders de 32 a 44 kg de PV alimentats amb dietes baixes en PB (11% sobre MS), podien produir amb la mateixa eficàcia que els alimentats amb una dieta elevada en PB (16% sobre MS) i obtenint un PV final similar. Així doncs, això ens permet filar el fil més prim i focalitzar els rangs de % de PB que s'haurien d'utilitzar realment en les dietes dels pinsos dels corders d'engreix, ja que el fet de poder reduir el % de PB ens permetria optimitzar millor els recursos, reduir l'excreció de nitrogen en forma d'emissions d'amoniac i reduir les despeses d'alimentació. Amb aquest fi, monitoritzar els nivells en sang dels catabòlits de proteïna, ens permetria optimitzar el contingut de PB en les dietes d'aquests animals (Costa et al., 2017). Segons Pelegrin, la urea plasmàtica és un bon indicador de l'aportament de proteïna bruta en la dieta de corders d'engreix, amb independència de l'hora d'extracció de la mostra (Pelegrin, 2019). La urea en sang és un indicador del nivell de proteïna ingerida o mobilitzada, mentre que la creatinina en sang reflexa la degradació de creatinina implicada en el metabolisme energètic muscular (Bilancio et al., 2014). No obstant això, s'ha de tenir en compte que l'aprofitament dels nutrients ve condicionat pel potencial genètic de creixement i l'estat sanitari dels corders (Alvarez, 2018); és a dir, sota les condicions de l'experiment podem suposar que no hi ha diferències significatives entre ambdós tractaments, però s'haurien de realitzar altres estudis per a confirmar els nostres resultats en altres condicions sanitàries, races, sexes o % de PB en el pinso.

## 8. Conclusions

Finalment, en aquest estudi podem confirmar que aparentment no semblen haver-hi diferències significatives entre el tractament 1 (alimentats durant 3 setmanes amb un 20,4% de PB i 3 setmanes amb un 19,1%) i el tractament 2 (alimentats durant 3 setmanes amb 18,3% de PB i 3 setmanes amb un de 17,4%) sobre l'expressió de les citocines proinflamatòries (IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ) i antiinflamatòries (IL-10 i TGF- $\beta$ ) en l'ili i el rumen de corders d'engreix de la raça Ripollesa. Per tant, utilitzar un pinso amb baix contingut de proteïna bruta (18,3% de PB en la fase de creixement i 17,4 % de PB en la fase d'engreix), permetria optimitzar millor els recursos, reduir l'excreció de nitrogen en forma d'emissions d'amoniac i reduir les despeses d'alimentació, sense repercutir en l'expressió de les citocines estudiades en els teixits d'ili i rumen.

## 9. Bibliografia

1. Abbasi, I. H. R., Sahito, H. A., Abbasi, F., Menghwar, D. R., Kaka, N. A. i Sanhjirani, M. I. (2014). Impact of different crude protein levels on growth of lambs under intensive management system. IJAR. 2(4):227-235.
2. Alvarez, J., Joy, M., Molina, E., Blanco, M., Lobon, S. i Villalba, D. (2018). Nivell de proteïna en pinsos d'engreix de corders. Albèitar. Pp. 26-27.
3. Andrew, E.W. (2012). Mucosal and Body Surface Defences. 1<sup>a</sup> edició, John Wiley & Sons, Ltd, Estats Units: pp. 133-155.
4. Athanasuadou, S., Houdijk, J. i Kyriazakis, I. (2008). Exploiting synergisms and interactions in the nutritional approaches to parasite control in sheep production Systems. Small. Rumin. Res. 76: 2-11.
5. Boon, P. (1995). Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. J. Nutrition. 125 (6): 1804S-1808S.
6. Bown, M. D., Poppi, D. P. i Sykes, A. R. (1991). The effect of postruminal infusion of protein or energy on the pathophysiology of *Trichostrongylus colubriformis* infection and body composition in lambs. Aust. J. Agric. Res. 42, 253-267.
7. Butter, N. L., Dawson, J. M., Wakelin, D. i Buttery, P. J. (1999). Effect of dietary tannin and protein concentration on nematode infection (*Trichostrongylus colubriformis*) in lambs. J. Agric. Sci. 134: 89-99.
8. Calder, P. C. (1995). Fuel utilisation by cells of the immune System. Proc. Nutr. Soc. 54(1): 65-82.
9. Coop, R. L., Huntley, J. F. i Smith, W. D. (1995). Effect of dietary protein supplementation on the development of immunity to *Ostertagia circumcincta* in growing lambs. Res. Vet. Sci. 59: 24-29.
10. Coop, R. L. i Holmes, P. H. (1996). Nutrition and parasite interaction. Int. J. Parasitol. 26 (8-9): 951-62.
11. Coop, R. L. i Kyriazakis, I. (1999). Nutrition-parasite interaction. Vet. Parasitol. 84 (3-4): 187-204.
12. Coop, R. L. i Kyriazakis, I. (2001). Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. Trends Parasitol. 17 (7): 325-30.
13. Court, J., Hides, S. i Webb-Ware, J. (2010). Sheep farming for meat and wool. CSIRO, Australia: pp: 61-112.
14. Datta, F. U., Nolan, J. V., Rowe, J. B. I Gray, G. D. (1998). Protein supplementation improves the performance of parasitised sheep fed a straw-based diet. Int. J. Parasitol. 28:1269-1278.
15. Datta, F. U., Nolan, J. V., Rowe, J.B, Gray, G. D. i Crook, B. J. (1998). Long-term effects of short-term provision of protein-enriched diets on resistance to nematode infection, and live-weight gain and wool growth in sheep. Int. J. Parasitol. 29: 479-488.
16. Delves, P.J.; Martin, S.J.; Burton, D.R. i Roitt, I.M. (2013). Immunologia Fonaments. 12<sup>a</sup> edició, Medica Paranaamericana S.A., Hong Kong, Xina: pp. 22-246.

17. Donaldson, J., Van Houtert, M. F. J i Sykes, A. R. (1998). The effect of nutrition on the periparturient parasite status of mature ewes. *Animal Sci. J.* 67, 523-533.
18. Dröge, W. i Breikreutz, R. (2000). Glutathione and immune function. *Proc. Nutr. Soc.* 59 (4): 595-600.
19. Ferret, A., Calsamiglia, S., Bach, A., Devant, M., Fernández, C. i García-Rebollar, P. (2008). Necesitats nutricionals per a remugants en engreix: normes FEDNA. Edicions peninsular. S.L., Madrid, Espanya: pp. 20-29.
20. Freer, M. i Dove, H. (2002). Sheep nutrition. CABI, Australia: pp: 51-258.
21. French, A. T., Knight, P. A., Smith, W. D., Pate, J. A., Miller, H. R. P. i Pemberton, A. D. (2009). Expression of three intelectins in sheep and response to a Th2 environment. *Vet. Res.* 40(6): 53.
22. Frutos, J., Andrés, S., Trevisi, E., Benavides, J., Santos, N., Santos, A. i Giráldez, F. J. (2018). Moderated milk replacer restriction of ewe lambs alters gut immunity parameters during the pre-weaning period and impairs liver function and animal performance during the replacement phase. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 243:80-89.
23. Frutos, J., Andrés, S., Yáñez-Ruiz, D. R., Benavides, J., López, S., Santos, A., Martínez-Valladares, M., Rozada, F. i Giráldez, F. J. (2008a). Early feed restriction of lambs modifies ileal epimural microbiota and affects immunity parameters during the fattening period. *Animals* (Apr. (22)), 1-8.
24. Frutos, J., Andrés, S., Trevisi, E., Yáñez-Ruiz, D. R., López, S., Santos, A. i Giráldez, F.J. (2018b). Early feed restriction programs metabòlic disorders in fattening merino lambs. *Animals* 8 (6), 83.
25. Gentry, L. R., Fernandez, J. M., Ward, T. L., White, T. W., Southern, L. L., Bidner, T. D., Thompson, D. L. i Horohov, D. W. (1999). Dietary protein and chromium tripicolinate in suffolk wether lambs: effects on production characteristics, metabòlic and hormonal responses, and immune status. *J. Anim. Sci.* 77:1284-1294.
26. Goddeeris, M. L. i Morrison, Ivan. (1994). Cell-Mediated immunity in ruminants. CRC Press, Inc. U.S.A: pp. 75-86.
27. González, R., Zamora, Z. i Alonso, Y. (2009). Anti-inflammatory cytokines and their actions and effects in the sepsis and septic shock. *REDVET.* 10(8): 1695-7504.
28. Gropp, J. i Birzer, D. (1989). Nutritionally not microbially induced immunosuppression. *Ubersich. Tieremahr.* 17:85-97.
29. Haile, A., Tembely, S., Anindo, D. O., Mukasa-Mugerwa, E., Rege, J. E. O., Yamo, A. i Baker, R. L. (2002). Effects of breed and dietary protein supplementation on the responses to gastrointestinal nematode infections in Ethiopian sheep. *Small. Rumin. Res.* 44: 247-261.
30. Hernandez-Castellano, L. E., Almeida, A. M., Ventosa, M., Coelho, A. V., Castro, N. i Argüello, A. (2014). The effect of colostrum intake on blood plasma proteome profile in newborn lambs: low abundance proteins. *BMC Vet. Res.* 10:85.
31. Houdijk, J. G. M., Jessop, N. S. i Kyriazakis, I. (2001). Nutrient partitioning between reproductive and immune functions in animals. *Proc. Nutr. Soc.* 60:515-525.

32. Houdijk, J.G.M., Kyriazakis, I., Jackson, F., Huntley, J. F. i Coop, R. L. (2000). Can an increased metabolizable protein intake affect the periparturient relaxation in immunity against *Teladorsagia circumcincta* in sheep? Vet. Parasitol. 91 (1-2): 43-62.
33. Houdijk, J. G. M., Kyriazakis, I., Coop, R. L. i Jackson, F. (2001). The expression of immunity to *Teladorsagia circumcincta* in ewes and its relationship to protein nutrition depend on body protein reserves. Parasitology. 122: 661-672.
34. Houdijk, J. G. M., Kyriazakis, I., Jackson, F., Huntley, J. F. i Coop, R. L. (2004). Effects of protein supply and reproductive status on local and systemic immune responses to *Teladorsagia circumcincta* in sheep. Vet. Parasitol. 129: 105-117.
35. Houdijk, J. G. M., Jackson, F., Coop, R. L. i Kyriazakis, I. (2005). Rapid improvement of immunity to *Teladorsagia circumcincta* is achieved through a reduction in the demand for protein in lactating ewes. Int. J. Parasitol. 36: 219-227.
36. Houtert, M. F. J., Barger, I. A., Steel, J. W., Windon, R. G. i Emery, D. L. (1994). Effects of dietary protein intake on responses of Young sheep to infection with *Trichostrongylus colubriformis*. Vet. Parasitol. 56: 163-180.
37. Israf, D. A., Coop, R. L., Stevenson, L. M., Jones, D. G., Jackson, F., Jackson, E., MacKellar, A. i Huntley, J. F. (1996). Dietary protein influences upon immunity to *Nematodirus battus* infection in lambs. Vet. Parasitol. 61: 273-286.
38. Kahn, L. P., Knox, M.R., Gray, G. D. i Corbett, J. L. (1999). Enhancing immunity to nematode parasites in pregnant and lactating sheep through nutrition parasites in pregnant and lactating sheep through nutrition and genetic selection. Recent Advances in Animal Nutrition, Australia. 12, 15-22.
39. Kahn, L. P., Kyriazakis, I., Jackson, F. i Coop, R. L. (2000). Temporal effects of protein nutrition on the growth and immunity of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis*. Int. J. Parasitol. 30: 193-205.
40. Kahn, L. P., Knox, M. R., Gray, G. D., Lea, J. M. i Walkden-Brown, S. W. (2003). Enhancing immunity to nematode parasites in single-bearing Merino ewes through nutrition and genetic selection. Vet. Parasitol. 112: 211-225.
41. Khan, F. A., Sahoo, A., Sonawane, G. G., Karim, S. A., Dhakad, S., Pareek, A. K. i Tripathi, B. N. (2012). Effect of dietary protein on responses of lambs to repeated *Haemonchus contortus* infection. Livest. Sci. 150: 143-151.
42. Kambara, T. McFarlane, R. G., Abell, T. J., McAnulty, R. W. i Sykes, A. R. (1993). The effect of age and dietary protein on immunity and resistance in lambs vaccinated with *Trichostrongylus colubriformis*. Int. J. Parasitol. 23(4): 471-476.
43. Kamabara, T. i McFarlane, R.G. (1995). Changes in T cell subpopulations of sheep due to age and dietary protein intake; association with protective immunity to *Trichostrongylus columbriformis*. Vet. Immunol. Immunopathol. 52: 127-135.
44. Kidane, A., Houdijk, J. G. M., Athanasiadou, S., Tolkamp, B. J. i Kyriazakin, I. (2010). Effects of maternal protein nutrition and subsequent grazing on chicory (*Cichorium intybus*) on parasitism and performans of lambs. J. Anim. Sci. 88:1513-1521.



45. Kidane, A., Houdijk, J. G. M., Tolkamp, B. J., Athanasiadou, S. i Kyriazakis, I. (2009). Consequences of infection pressure and protein nutrition on periparturient resistance to *Teladorsagia circumcincta* and performance in ewes. *Vet. Parasitol.* 165: 78-87.
46. Kyriazakis, I. i Oldham, J. D. (1993). Diet selection in sheep: the ability of growing lambs to select a diet that meets their crude protein (nitrogen x 6,25) requirements. *Br. J. Nutr.* 69:617-629.
47. Liu, J., Bian, G., Sun, D., Zhu, W. i Mao, S. (2017). Starter feeding supplementation alters colonic mucosal bacterial communities and modulates mucosal immune homeostasis in newborn lambs. *Front. Microbiol.* 8:429.
48. Lewis, R. A. i Austin, K. F. (1981). Mediation of local homeòstasis and inflammatory by leukotrienes and other mast cell-dependent compounds. *Nature.* 293 (5828): 103-108.
49. López, F., Rodríguez, P.L., Agudo, B., Aceituno, O., García, G., Chaso, M.A. i Pascual, M.R. (2015). Estudi de la relació proteïna: energia òptima per a la fase inicial d'engreix de corders merins. XVI Jornades sobre Producció Animal de l'Associació Interprofessional per al desenvolupament Agrari, Zaragoza, Espanya. Tom 1, pp: 173-175.
50. Nagalakshmi, D., Dhanalakshmi, K. i Himabindu, D. (2011). Replacement of groundnut cake with sunflower and karanj seed cakes on performance, nutrient utilisation, immune response and carcass characteristics in Nellore lambs. *Small. Rumin. Res.* 97: 12-20.
51. MacRae, J. C. (1993). Metabolic consequences of intestinal parasitism. *Proc. Nutr. Soc.* 52 (1): 121-130.
52. Ocak, N., Cam, M. A. i Kuran, M. (2004). The effect of high dietary protein levels during late gestation on colostrum yield and lamb survival rate in singleton-bearing ewes. *Small. Rumin. Res.* 56: 89-94.
53. Pelegrin, J., Serrano-Pérez, B., Villalba, D., Molina, E. i Álvarez-Rodríguez, J. (2019). Efecte de l'hora del dia sobre els catabòlits de proteïna en corders amb diferent nivell de proteïna bruta en el pinso. XVIII Jornades sobre Producció Animal de l'Associació Interprofessional per al Desenvolupament Agrari, Zaragoza, Espanya. Tom 1, pp:185.
54. Pelegrin, J., Villalba, D., Molina, E., Serrano-Pérez, B., Espinal, J., Joy, M. i Álvarez-Rodríguez, J. (2019). Efecte del nivell de proteïna bruta en el pinso d'engreix de corders sobre els seus resultats productius. XVIII Jornades sobre Producció Animal de l'Associació Interprofessional per al Desenvolupament Agrari, Zaragoza, Espanya. Tom 1, pp:182.
55. Reeds, P. J. Fjeld, C. R. i Jahoor, F. (1994). Do the differences between the amino acid compositions of acute-phase and muscle proteins have a bearing on nitrogen loss in traumatic states?. *J. Nutr.* 124(6): 906-10.
56. Rojo, C. i González, M. E. (2013). Anatomía Veterinaria. 10. Estómago de los ruminantes. Anatomías externa e interna. Surco gástrico. Posición y relaciones anatómicas. Fijaciones. *RE.* 5 (2): 28-42.

57. Sayers, G., Good, B., Hanrahan, J. P., O'donovan, J., Mulcahy, G. i Sweeney, T. (2007). Breed differences in mucosal and systemic antibody response to nematode infection in sheep: an important role for IgE?. *Parasitology*. 135:71-80.
58. Sevi, A., Napolitano, F., Casamassima, D., Annicchiarico, G., Quarantelli, T. i Paola, R. (1999). Effect of gradual transition from maternal to reconstituted milk on behavioural, endocrine and immune responses of lambs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 64: 249-259.
59. Shakya, K.P., Miller, J.E. i Horohov, D.W. (2009). A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Vet. Parasitol.* 163: 57-66.
60. Shaw, K. L., Nolan, J. V., Lynch, J. J., Coverdale, O. R. i Gill, H. S. (1995). Effects of weaning, supplementation and gender on acquired immunity to *Haemonchus contortus* in lambs. *Int. J. Parasitol.* 25(3): 381-387.
61. Singh, V. K., Pattanaik, A. K., Goswami, T. K. i Sharma, K. (2013). Effect of varying the energy density of protein-adequate diets on nutrient metabolism, clinical chemistry, immune response and growth of muzaffarnagari lambs. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 26(8): 1089-1101.
62. Sykes, A. R. (2000). Environmental effects on animal production: the nutritional demands of nematode parasite exposure in sheep. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 13:343-350.
63. Sykes, A. R. (2010). Host immune responses to nematodes: benefit or cost? Implications for future development of sustainable methods of control. *R. Bras. Zootec.* 39: 376-382.
64. Tizard, I.R. (2009). *Immunologia veterinària*. 8<sup>a</sup> edició, Elsevier S.A., Barcelona, Espanya: pp. 1-80.
65. Takahashi, K., Ohta, N. i Akiba, Y. (1997). Influences of dietary methionine and cysteine on metabolic responses to immunological stress by *Escherichia coli* lipopolysaccharide injection, and mitogenic response in broiler chickens. *Br. J. Nutr.* 78(5): 815-21.
66. Tizard, I. R. (2018). *Immunologia veterinària*. 10<sup>a</sup> edició, Elsevier S. A., Barcelona, Espanya: pp. 224-226.
67. Trichet, W. (2010). Nutrition and immunity: an Update. *Aquac. Res* 41(3): 356-72.
68. Tripathi, M. K. i Karim, S. A. (2010). Effect of individual and mixed live yeast culture feeding on growth performance, nutrient utilization and microbial crude protein synthesis in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 155: 163-171.
69. Vagenas, D., Bishop, S. C. i Kyriazakis, I. (2007). A model to account for the consequences of host nutrition on the outcome of gastrointestinal parasitism in sheep: model evaluation. *Parasitology*. 134:1279-1289.
70. Vagenas, D., Bishop, S. C. i Kyriazakis, I. (2007). A model to account for the host nutrition on the outcome of gastrointestinal parasitism in sheep: logic and concepts. *Parasitology*. 134:1263-1277.

71. Van Houtert, M. F. J., Barger, I. A., Steel, J. W., Windon, R. G. i Emery, D. L. (1995). Effects of dietary protein intake on responses of Young sheep to infection with *Trichostrongylus colubriformis*. Vet. Parasitol. 56: 163-180.
72. Van Houtert, M. F. J., Barger, I. A. i Steel, J. W. (1995). Dietary protein for Young grazing sheep: interactions with gastrointestinal parasitism. Vet. Parasitol. 60:283-295.
73. Van Houtert, M. F. J. i Sykes, A. R. (1996). Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. Int. J. Parasitol. 26(11):1151-1168.
74. Wood, P. R. i Seow, H. F. (1996). T cell cytokines and disease prevention. Vet. Immunol. Immunopathol. 54:33-44.
75. Zaralis, K., Tolkamp, B. J., Houdijk, J. G. M, Wylie, A. R. G. i Kyriazakis, I. (2009). Consequences of protein supplementation for anorexia, expression of immunity and plasma leptin concentrations in parasitized ewes of two breeds. Br. J. Nutr. 101:499-509.
76. Zhang, Q., Li, C., Niu, X., Zhang, Z., Li, F. i Li, F. (2018). An intensive milk replacer feeding program benefits immune response and intestinal microbiota of lambs during weaning. BMC Vet. Res. 14:366.

## 10. Webgrafia

1. Barreto, A. Reconeixement en el sistema immune innat. Disponible en <[https://www.academia.edu/28869058/Reconocimiento\\_en\\_el\\_sistema\\_inmune\\_innato](https://www.academia.edu/28869058/Reconocimiento_en_el_sistema_inmune_innato)> [Consulta dia 2 de març del 2019].
2. Conselleria d'Agricultura, Pesca i Desenvolupament Rural. (2013). Informe sobre el sector oví andalús. Disponible en <[https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Publicacixn\\_Ovino.130513.pdf](https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Publicacixn_Ovino.130513.pdf)> [Consulta dia 17 de juliol del 2018].
3. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Producció ecològica d'ovins. (2015). Disponible en <<https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/folletoovino.pdf>> [Consulta dia 17 de juliol del 2018].
4. Cooperatives agro-alimentaries d'Espanya. (2016). En el Fòrum d'Oví de Carn 2015/2016 la Comissió Europea analitza el futur del sector oví. pp. 46-48. Disponible en <<http://www.agro-alimentarias.coop/ficheros/doc/05118.pdf>> [Consulta dia 17 de juliol del 2018].
5. Ministeri d'Agricultura, Alimentació i Medi Ambient. (2012). Madrid 2012. Anàlisi de l'evolució del sector oví espanyol. Impacte dels règims d'ajudes i estratègies a impulsar (2006-2012). Direcció General de Produccions i Mercats Agraris, Subdirecció General de Productes Ramaders. Disponible en <[https://www.mapa.gob.es/eu/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/An%C3%A1lisis%20de%20la%20evoluci%C3%B3n%20del%20sector%20ovino%20espa%C3%B1ol\\_tcm35-58889.pdf](https://www.mapa.gob.es/eu/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/An%C3%A1lisis%20de%20la%20evoluci%C3%B3n%20del%20sector%20ovino%20espa%C3%B1ol_tcm35-58889.pdf)> [Consulta dia 15 de juliol del 2018].
6. Ministeri d'Agricultura, Alimentació i Medi Ambient. (2015). Madrid 2015. Informe Nacional d'Oví i cabrum 2015. RENGRANTI. Disponible en <<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados->

- [ganaderos/informeovinocaprino\\_2015\\_web\\_tcm30-109565.pdf](#)> [Consulta dia 15 de juliol del 2018].
7. Ministeri d'Agricultura i Pesca, Alimentació i Medi Ambient. (2017). Madrid 2017. El sector oví i caprí de carn en xifres. Principals indicadors econòmics. Direcció General de Produccions i Mercats Agraris. Disponible en <[https://www.mapa.gob.es/gl/ganaderia/publicaciones/indicadoreseconomicosde lsectorovinoycaprino2016\\_tcm37-428265.pdf](https://www.mapa.gob.es/gl/ganaderia/publicaciones/indicadoreseconomicosde lsectorovinoycaprino2016_tcm37-428265.pdf)> [Consulta dia 17 de juliol del 2018].
  8. Ministeri d'Agricultura i Pesca, Alimentació i Medi Ambient. (2017). Situació de mercat sector oví i caprí. Disponible en <[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/situaciondemercadoovinoycaprinosectorial201720\\_tcm30-381381.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/situaciondemercadoovinoycaprinosectorial201720_tcm30-381381.pdf)> [Consulta dia 18 de juliol del 2018].
  9. Ministeri d'Agricultura i Pesca, Alimentació i Medi Ambient. (2018). Madrid 2018. El sector oví i caprí de carn en xifres. Principals indicadors econòmics. Direcció General de Produccions i Mercats Agraris. Disponible en <[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/indicadoreseconomicosovinoycaprinocarne2018\\_tcm30-428265.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/indicadoreseconomicosovinoycaprinocarne2018_tcm30-428265.pdf)> [Consulta dia 17 de juliol del 2018].
  10. Rodríguez, L., Sánchez, M., Alcaide, M.J., Sierra, I., Lavín, M.P., Mantecón, A.R., Pérez, V., De la fuente, L.F., Gonzáles, J.M., Muñoz, E.M. i Marcos, J.C. (2012). Informe de la Societat Espanyola d'Ovinotècnia i Caprinotècnia (SEOC) del sector oví i caprí a Espanya: any 2012. Disponible en <[http://seoc.eu/wp-content/uploads/2016/06/seoc\\_informe\\_ovino\\_caprino\\_2012.pdf](http://seoc.eu/wp-content/uploads/2016/06/seoc_informe_ovino_caprino_2012.pdf)> [Consulta dia 16 de juliol del 2018].
  11. Rúa, M. (2017). Remugants més eficients per al pasturatge. Disponible en <<https://culturaempresarialganadera.org/2017/02/23/rumiantes-mas-eficientes-para-el-pastoreo-capitulo-1/>> [Consulta dia 3 de març del 2019].
  12. Protocol PCR en temps real. Disponible en <[https://www.researchgate.net/publication/259042551\\_PCR\\_en\\_tiempo\\_real](https://www.researchgate.net/publication/259042551_PCR_en_tiempo_real)> [Consulta 22 de juliol del 2018].
  13. Protocol Removal of Genomic DNA from RNA preparations. Disponible en <[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013178\\_Removal\\_Genomic\\_DNA\\_from\\_RNA\\_Preparations\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013178_Removal_Genomic_DNA_from_RNA_Preparations_UG.pdf)> [Consulta dia 20 de juliol del 2018].
  14. Protocol SYBR® Green PCR Master Mix and SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit. Disponible en <[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms\\_041053.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_041053.pdf)> [Consulta dia 20 de juliol del 2018].
  15. Protocol TRIzol® Reagent. Disponible en <[file:///C:/Users/propietari/Downloads/trizol\\_reagent.pdf](file:///C:/Users/propietari/Downloads/trizol_reagent.pdf)> [Consulta dia 20 de juliol del 2018].
  16. Sánchez, J.M. (2010). Curs d'introducció a la immunologia porcina. Disponible en <<http://apps.sanidadanimal.info/cursos/inmunologia/ca061.htm>> [Consulta dia 26 de febrer del 2019].
  17. Van, E. (2010). Anatomia digestiva. Disponible en <<http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/AFA/TEORICOS/21%20-%20Anatomia%20digestiva.pdf>> [Consulta dia 3 de març del 2019].

## 11. Annexos

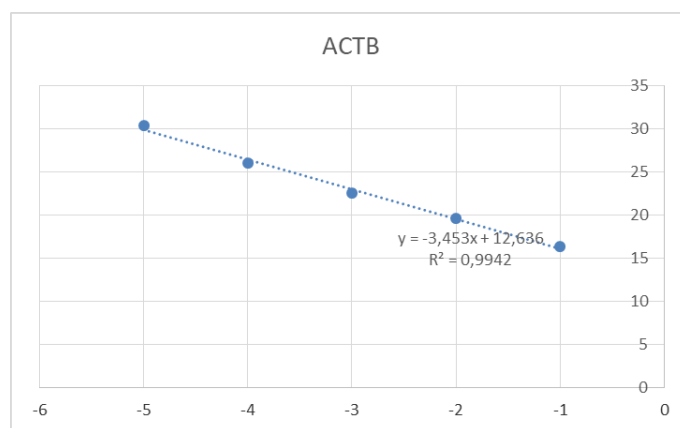
Annex 1. Tractament de proteïna en el pinso.

<i>Tractament</i>	<i>Període</i>		
	12-14 kg de PV	14-19 kg de PV	19-25 kg de PV
<i>ALT</i>	18% PB	20,4% PB (T1 amb decoquinat)	18,3% PB (T3)
<i>BAIX</i>	18% PB	19,1% PB (T2 amb decoquinat)	17,4% PB (T4)

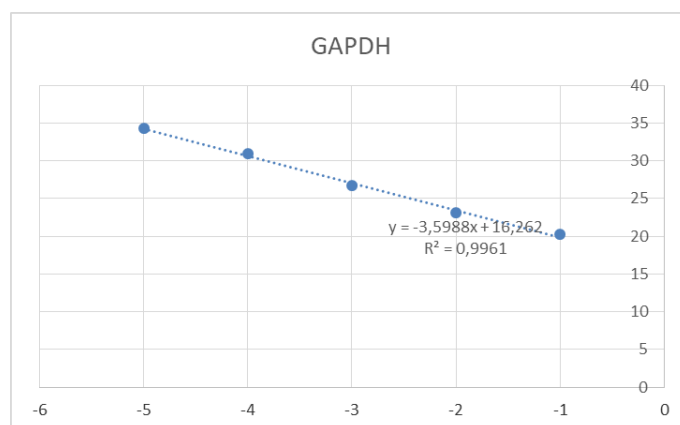
Annex 2. Composició dels pinsos emprats en l'experiment.

	<i>ALT</i>		<i>BAIX</i>	
	20,4% CP (T1) - decoquinat	18,3% CP (T2)	19,1% CP (T3) – decoquinat	17,4% CP (T4)
<i>Wheat</i>	29,99	29,99	30	29,99
<i>Barley</i>	20,56	23,08	21,83	25,53
<i>Maize</i>	30,56	23,3	21,95	23,65
<i>Maize DDGS</i>	6	6	6	6
<i>Soyabean meal</i>	16,05	10,74	13,37	7,94
<i>47% CP</i>				
<i>Rapeseed meal</i>	3,03	3,03	3,03	3,03
<i>CaCO<sub>3</sub></i>	2,34	2,4	2,34	2,4
<i>Salt</i>	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>NH<sub>4</sub>Cl</i>	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Vitamin-mineral premix</i>	0,47	0,47	0,47	0,47
	100	100,01	99,99	100,01
<i>PB calculada (%)</i>	17,8	15,8	16,8	14,8
<i>EE calculat (%)</i>	2,4	2,5	2,4	2,5
<i>FND – calculada (%)</i>	12,7	13,0	12,8	13,2
<i>FAD – calculada (%)</i>	4,8	4,7	4,7	4,7
<i>Almidó – calculat (%)</i>	41,9	44,9	43,4	46,4
<i>EM – calculada (kcal/kg)</i>	2701	2693	2698	2688
<i>UFC – calculada (UF/kg)</i>	1,0	1,0	1,0	1,0

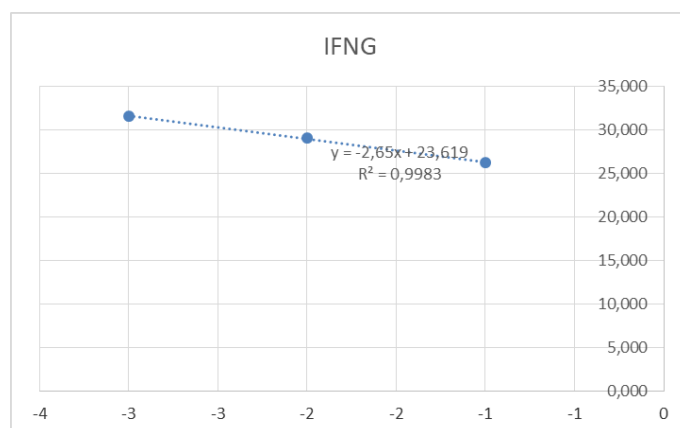
### Annex 3. Corba d'eficiència del gen ACTB.



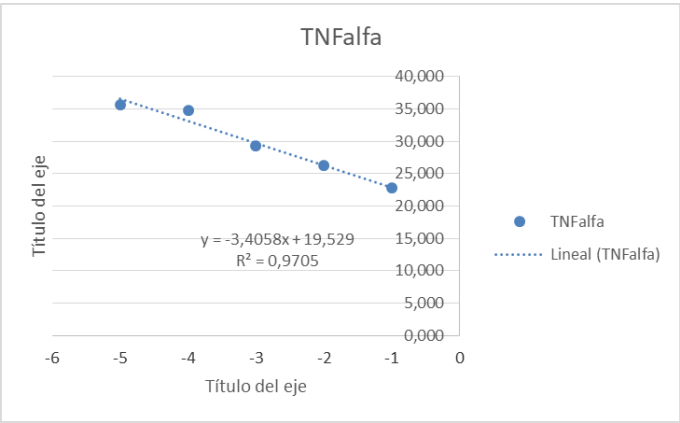
### Annex 4. Corba d'eficiència del gen GAPDH.



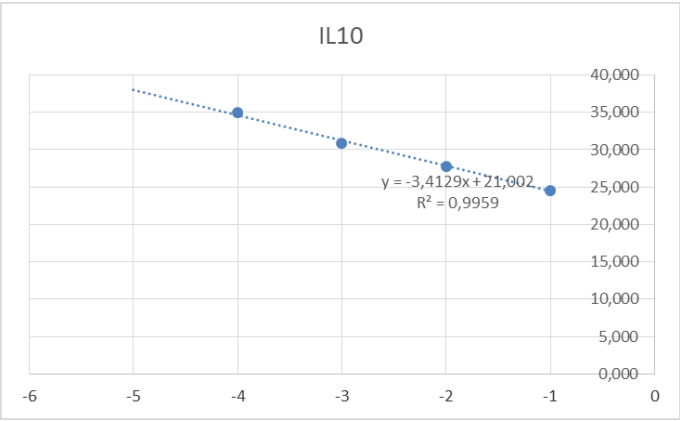
### Annex 5. Corba d'eficiència del gen IFN- $\gamma$ .



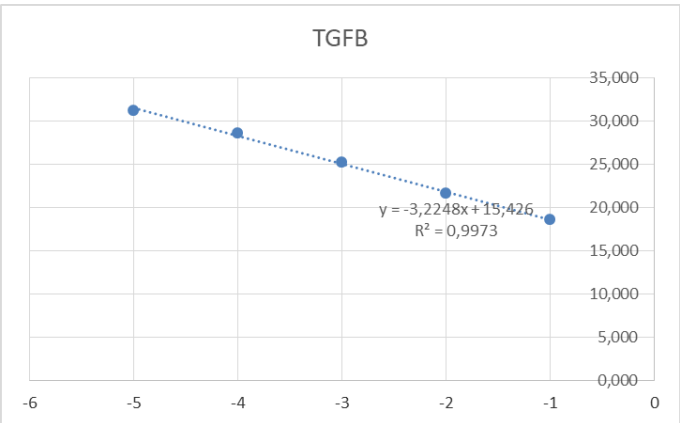
Annex 6. Corba d'eficiència del gen TNF- $\alpha$ .



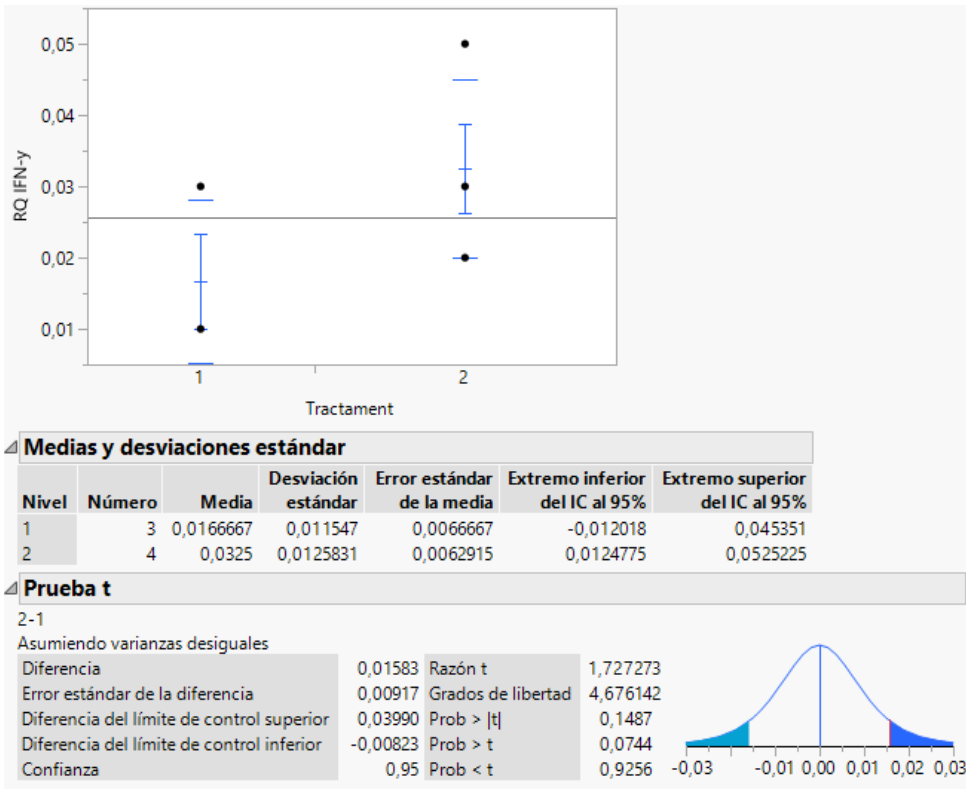
Annex 7. Corba d'eficiència del gen IL-10.



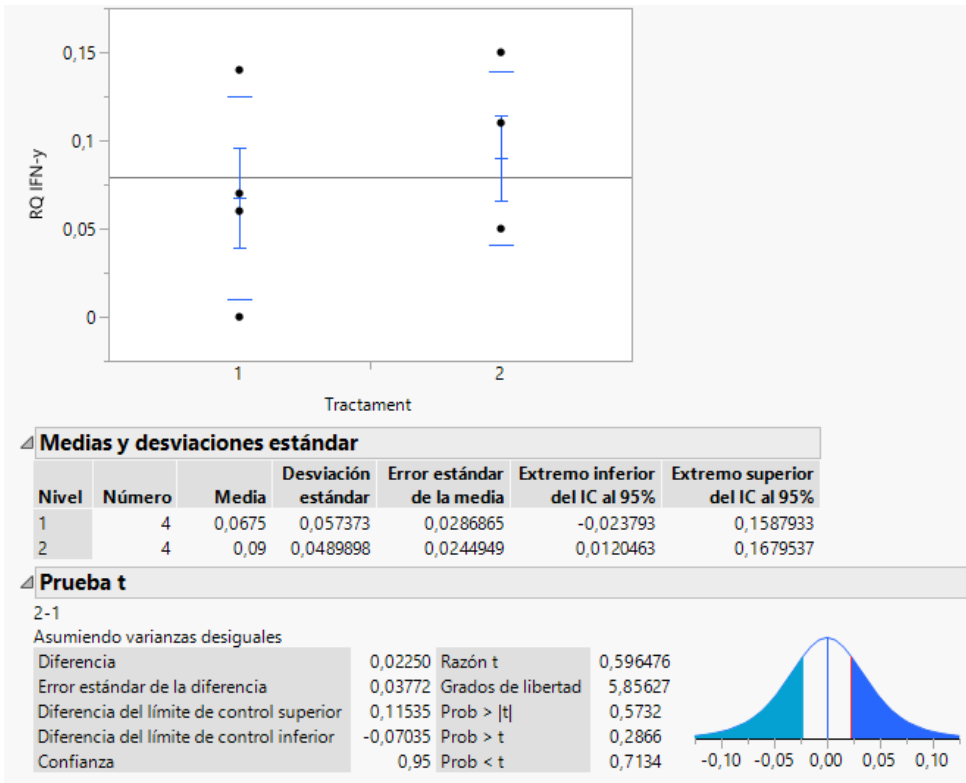
Annex 8. Corba d'eficiència del gen TGF- $\beta$ .



Annex 9. Anàlisi univariant de IFN- $\gamma$  en rumen en diferents tractaments.

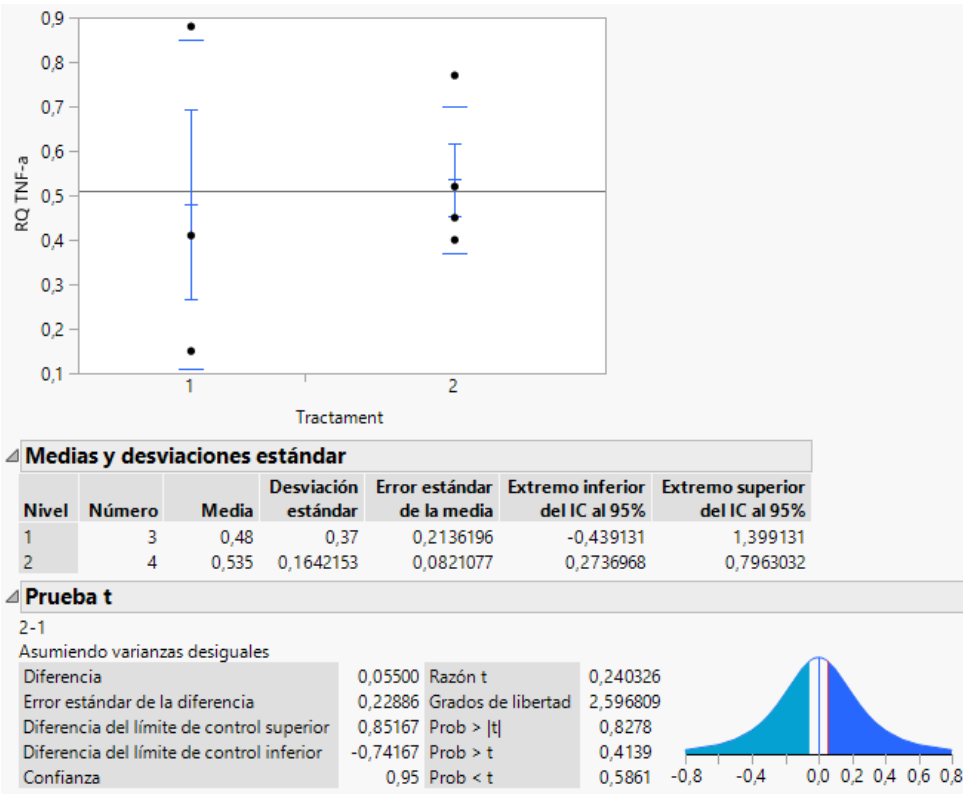


Annex 10. Anàlisi univariant de IFN- $\gamma$  en ili en diferents tractaments.

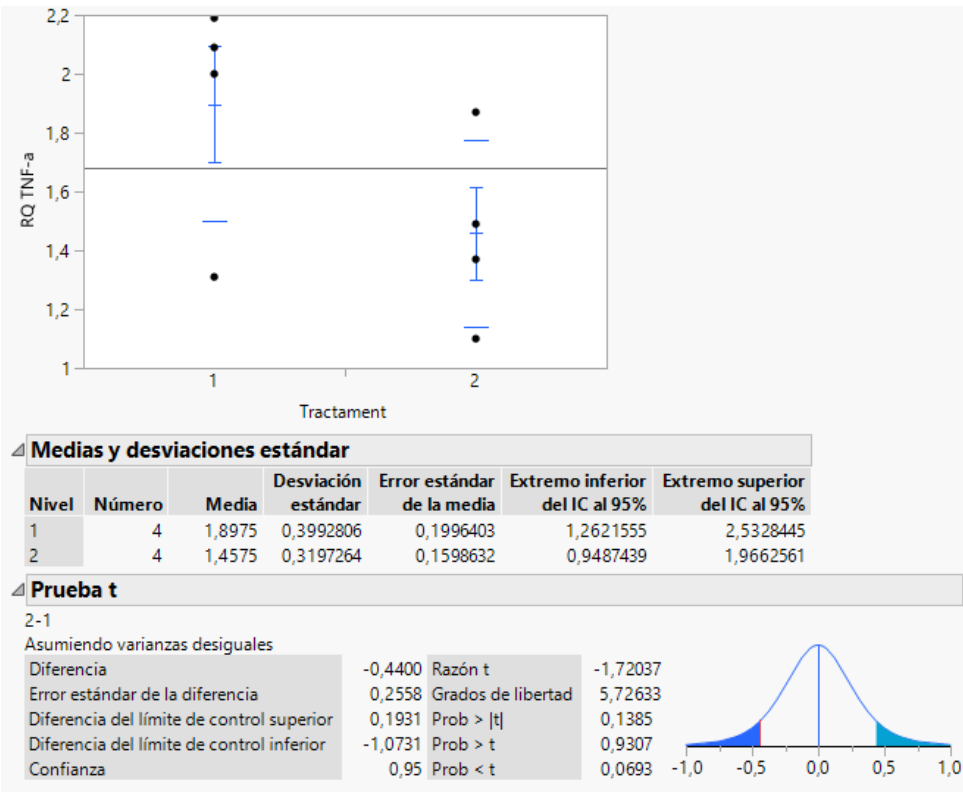




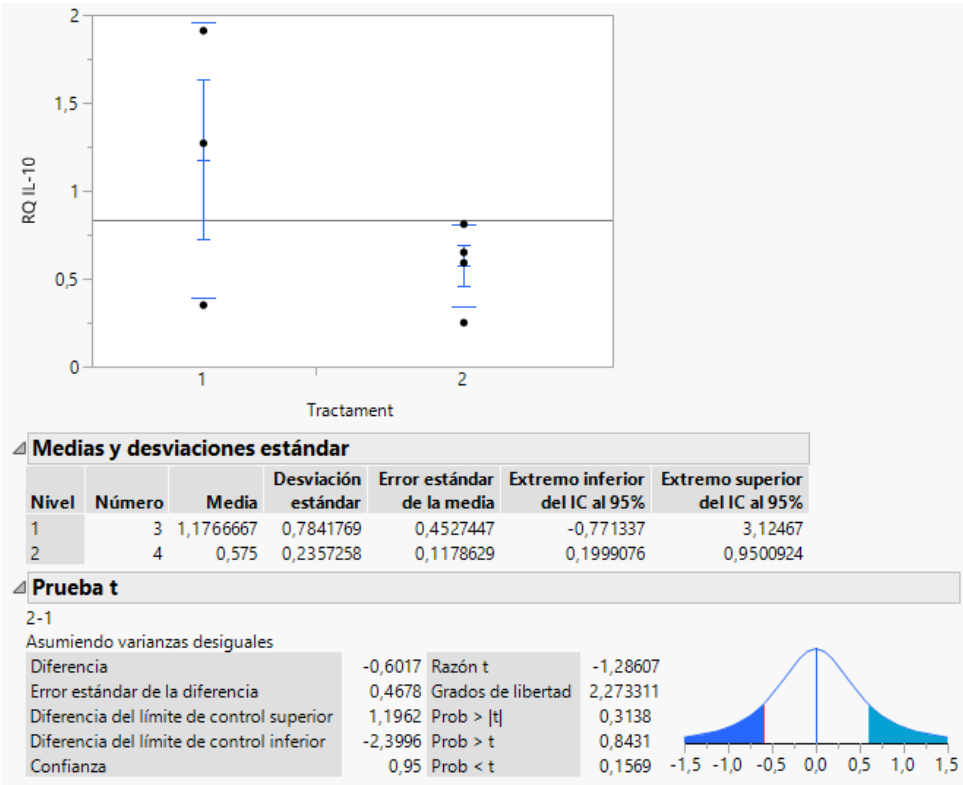
Annex 11. Anàlisi univariant de TNF- $\alpha$  en rumen en diferents tractaments.



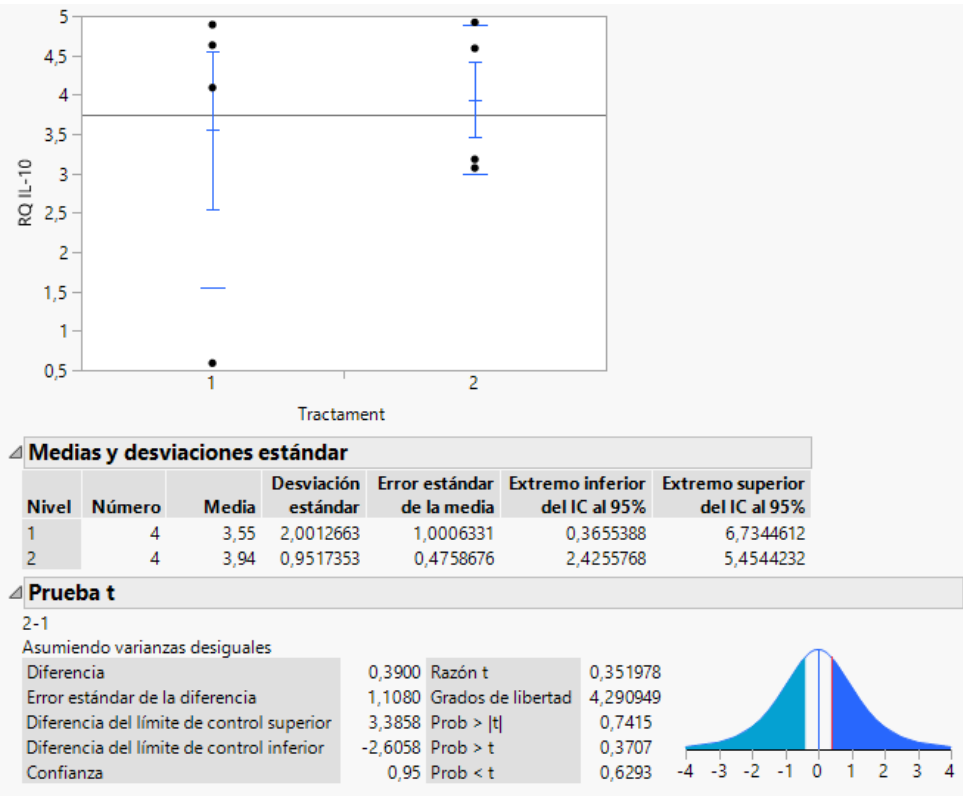
Annex 12. Anàlisi univariant de TNF- $\alpha$  en ili en diferents tractaments.



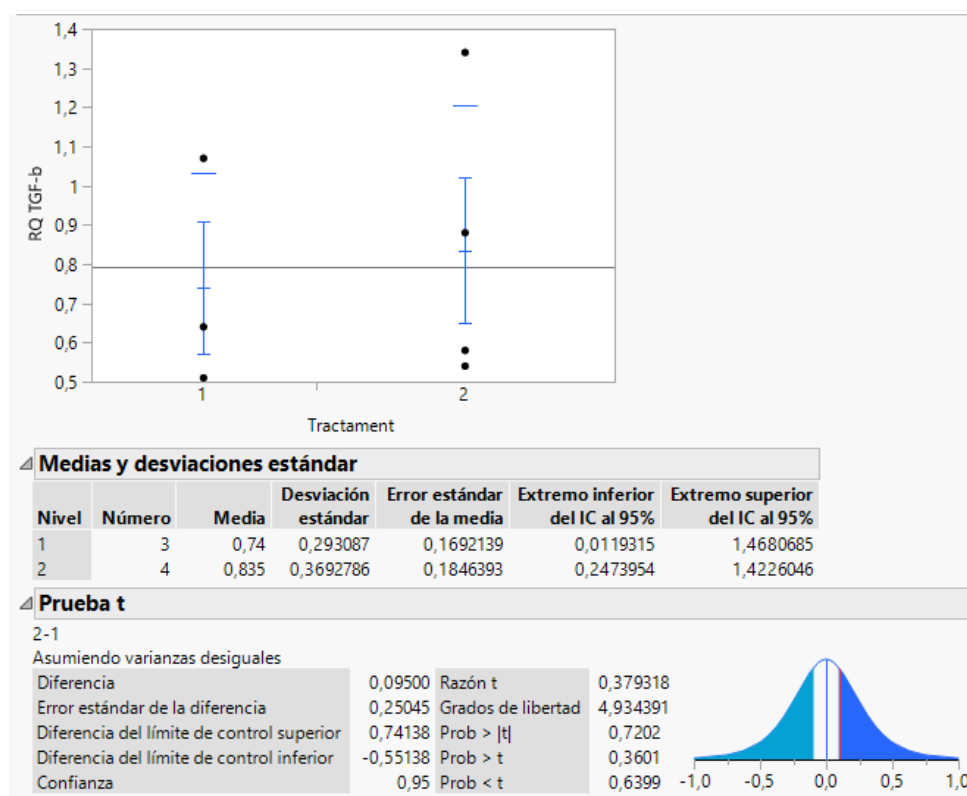
Annex 13. Anàlisi univariant de IL-10 en rumen en diferents tractaments.



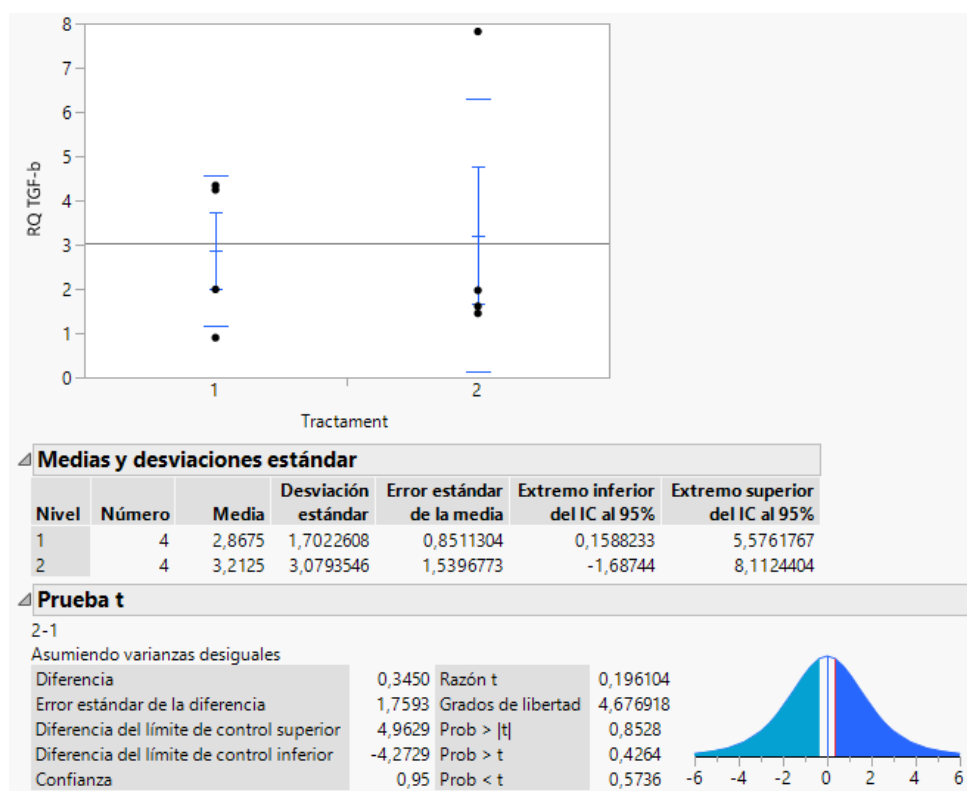
Annex 14. Anàlisi univariant de IL-10 en ili en diferents tractaments.



## Annex 15. Anàlisi univariant de TGF- $\beta$ en rumen en diferents tractaments.



## Annex 16. Anàlisi univariant de TGF- $\beta$ en ili en diferents tractaments.



Annex 17. Anàlisi univariant del pes al sacrifici en diferents tractaments.

